

**Charakterisierung von Neuronen im Bienenhirn, die das  
Neuropeptid „Pigment-Dispersing Factor“ (PDF) exprimieren  
sowie deren mögliche Rolle in der Inneren Uhr  
der Honigbiene *Apis mellifera***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
*Esther Kolbe*

aus  
München  
im Jahr  
2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 29.10.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Charlotte Förster

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

Erster Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Drittprüfer: Prof. Dr. Erhard Strohm

Unterschrift:

Für meine Kinder!

Aus Helme Heines Kinderbuch „Fälle für Freunde – Alle Geschichten aus Mullewapp“:



„Franz von Hahn war Frühaufsteher. Bereits eine viertel Stunde vor Sonnenaufgang weckte ihn eine innere Uhr. Schon oft hatte er sich gefragt, wer diese Uhr aufzog und sie stellte. Die Sonne? Warum aber wurde er auch dann geweckt, wenn der Himmel von Wolken bedeckt war und die Sonne überhaupt nicht schien? Und selbst im Winter [...], wachte er pünktlich 15 Minuten vor Sonnenaufgang auf. [...]

Vorsichtig öffnete er die Hühnerklappe, [...]. Majestätisch stolzierte er die Hühnerleiter hinab und erklomm den dampfenden Misthaufen.

Mit stolz gewölbter Brust [...] erwartete er den Sonnenaufgang. Plötzlich erwachte in ihm eine Idee. Vielleicht [...] war ja alles ganz anders. Vielleicht trug er überhaupt keine Uhr in seinem Körper. Vielleicht weckte früh am Morgen nicht die Sonne *ihn*, sondern umgekehrt *er* die Sonne auf. Es konnte doch sein, dass die Sonne so lange [...] mit ihrem Aufgang wartete, bis er [...] auf dem Misthaufen stand und krächte. [...]. Ja, so musste es sein. Das war es, was ihn von seinen Hühnern unterschied. Deshalb war er adelig und deshalb hieß er Franz von Hahn.“

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Rhythmisches Verhalten bei der Honigbiene <i>Apis mellifera</i>	2
1.2	Der schlafähnliche Zustand der Honigbiene	6
1.3	Lokalisation der Inneren Uhr	7
1.4	Molekulare Grundlagen der Inneren Uhr	10
1.5	Pigment-Dispersing Factor (PDF)	14
1.5.1	Grundlegendes zu PDF	14
1.5.2	Die PDF-Neurone und ihre Lage in ausgewählten Insektengehirnen	16
1.5.3	Hinweise zu den Funktionen von PDF in Insektengehirnen	20
1.6	Zielsetzung	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Die Experimente	25
2.1.1	Oszillationen in den PDF-Neuronen	25
2.1.2	Lokalisation von CRY-, PER- und TIM-Neuronen	27
2.1.3	Dreidimensionale Darstellung des PDF-Netzwerks in einem exemplarischen Gehirn von <i>Apis mellifera</i>	28
2.2	Probenahme von Honigbienen für die Versuche	29
2.3	Entrainment zur Synchronisation der Honigbienen	30
2.4	Aufbereitung der Proben	31
2.4.1	Probenahme nach dem Entrainment und Präparation der Bienengehirne	31
2.4.2	Einbetten der fixierten Bienengehirne	32
2.4.3	Schneiden am Vibratom	33
2.5	Immunhistochemie	33
2.5.1	Immunhistochemisches Färben der Bienengehirne	33
2.5.1.1	Färbungen zur Oszillation von PDF	35
2.5.1.2	Färbungen zur Lokalisation von PER-, TIM- und CRY-Neuronen	36
2.5.1.3	Ganzhirn-Färbungen für die dreidimensionale Rekonstruktion	37
2.5.2	Färbeprotokolle	38
2.6	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	44
2.7	Quantitative und qualitative Untersuchungen	45
2.7.1	Quantitative Untersuchung der Oszillation in den PDF-Neuronen	45
2.7.1.1	Die zu untersuchenden Bereiche im Gehirn der Honigbiene	46
2.7.1.2	Datenerhebung mit ImageJ	47
2.7.1.3	Auswertung mit Excel und Statistik	48
2.7.2	Qualitative Untersuchung der CRY-, PER- und TIM-Neurone	48
2.7.3	Die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks mit Amira®	49
2.7.3.1	Visualisierung der Neuropile	50
2.7.3.2	Visualisierung der Zellen	53
2.7.3.3	Visualisierung der Neuriten	54
2.7.3.4	Zusammensetzung aller rekonstruierten Strukturen	57
2.7.3.5	Rekonstruktions-Beispiele	60
2.7.3.5.1	Die PDF-Neurone und ihre unmittelbaren Projektionen	60
2.7.3.5.2	Ein Ausschnitt mit der POC und dem „Loop“	62
2.7.3.5.3	Ein Ausschnitt aus dem anterioren Protocerebrum	62
2.8	Verwendete Materialien und Geräte	63



<b>3 Ergebnisse</b>	<b>65</b>
3.1 PDF-Oszillationen im Gehirn der Honigbiene	65
3.1.1 Vergleich von Sammel- und Stockbienen unter LD	65
3.1.1.1 Versuchsreihe mit vier Zeitpunkten (1. Exp.)	65
3.1.1.2 Versuchsreihe mit sechs Zeitpunkten (2. Exp.)	67
3.1.2 Sammelbienen im Vergleich LD zu DD	71
3.1.2.1 PDF-Oszillationen bei Sammelbienen unter LD (3. Exp.)	71
3.1.2.2 PDF-Oszillationen bei Sammelbienen unter DD (4. Exp.)	76
3.2 Lokalisation möglicher TIM-, PER-, CRY-Neurone	81
3.3 Rekonstruktion des Honigbienengehirns	82
3.3.1 Orientierungshilfe	82
3.3.2 Neuropile	83
3.3.3 PDF-Zellen	89
3.3.4 PDF-Neuriten	89
3.3.4.1 Neuriten, die von den PDF-Neuronen wegziehen	91
3.3.4.2 Der „Loop“	93
3.3.4.3 PDF-Neuriten in den optischen Loben	98
3.3.4.3.1 PDF-Neuriten in der Medulla	99
3.3.4.3.2 PDF-Neuriten bei der Lobula	101
3.3.4.3.3 PDF-Neuriten in der Lamina	102
3.3.4.4 PDF-Neuriten im Protocerebrum	104
3.3.4.5 Kommissuren	118
3.3.4.6 PDF-Neuriten in den Ozellen	123
3.3.4.7 PDF-Neuriten im Deutocerebrum bzw. in den Antennalloben	126
<b>4 Diskussion</b>	<b>128</b>
4.1 PDF-Oszillationen im Gehirn der Honigbiene	128
4.1.1 Sammel- und Stockbienen anhand von vier Zeitpunkten (1. Exp.)	128
4.1.2 Sammel- und Stockbienen anhand von sechs Zeitpunkten (2. Exp.)	139
4.1.3 Wiederholung: Sammelbienen unter LD (3. Exp.)	146
4.1.4 Sammelbienen unter DD (4. Exp.)	153
4.2 Keine Koloalokalisation von PER- und PDF-Neuronen	158
4.3 Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene	159
4.3.1 Die PDF-Somata und eine mögliche akzessorische Medulla	159
4.3.2 Projektionen im Protocerebrum zusammen mit Kommissuren	163
4.3.3 Projektionen im visuellen System	165
4.3.4 Projektionen im olfaktorischen System	171
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>174</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>177</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis	177
6.2 Abbildungsverzeichnis	178
6.3 Tabellenverzeichnis	180
6.4 Literaturverzeichnis	181
<b>7 Danksagung</b>	<b>190</b>
<b>8 Erklärung</b>	<b>191</b>

# 1 Einleitung

Beinahe alle Organismen auf der Erde unterliegen dem täglichen Wechsel von Hell und Dunkel, der durch die Erdrotation bedingt ist. An diesen diurnalen Rhythmus passten sich im Laufe der Evolution die verschiedenen Lebewesen an. Sie entwickelten Innere Uhren, die ihnen einen zeitlichen Vorsprung für ihre speziellen Bedürfnisse an ihre Umwelt und damit einen Selektionsvorteil verschafften.

Ein derartiger Taktgeber besteht aus einem angeborenen, endogenen Oszillator, der ohne äußere Einflüsse, d. h. unter konstanten Bedingungen (konstante Temperatur, Dauerdunkel), eigenständig bzw. autonom schwingt; man spricht von sogenanntem Freilauf (Pittendrigh, 1954). Die freilaufende Periodenlänge ist artabhängig, beträgt meist ungefähr 24 Stunden (Bünning, 1958), weswegen Halberg (1959) den Begriff „circadian“ einführte (lat. *circa* = ungefähr und *dies* = Tag). Äußere Zeitgeber können die Uhr auf den in der Natur tatsächlich vorkommenden, zum Beispiel durch die Jahreszeiten bedingten unterschiedlichen Hell-Dunkel-Wechsel, oder auf exakt 24 Stunden synchronisieren. Der wichtigste exogene Zeitgeber für ein solches Entrainment stellt das Licht dar. Einer der ausgeprägtesten circadianen Zyklen ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Hierbei werden je nach Aktivitätsphase tag-, nacht- und dämmerungsaktive Tiere unterschieden. Jedoch können beispielsweise auch die Temperatur bzw. zyklische Temperaturveränderungen (z. B. Pittendrigh, 1954; Yoshii et al., 2005; Glaser and Stanewsky, 2007), soziale Kontakte (Levine et al., 2002), Mahlzeiten zu bestimmten Zeiten (Stephan, 2002) oder Erschütterungen (Förster and Engelmann, 1988) die Innere Uhr synchronisieren. Ein weiteres wichtiges Kriterium für circadiane biologische Rhythmen ist die Temperaturkompensation. Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen beschleunigt sich der Rhythmus in einem weiten Temperaturbereich nicht mit steigender Temperatur (Pittendrigh, 1954).

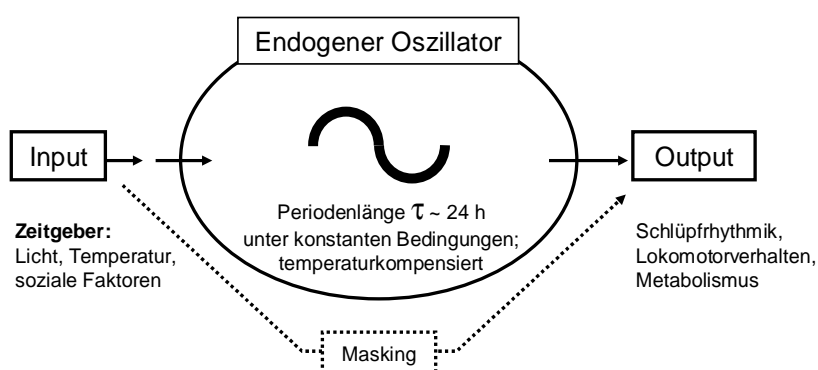


Abb. 1.1: Schema eines circadianen Systems, das aus drei Komponenten besteht: Input, endogener Oszillator und Output. Erklärung siehe Text (Abb. aus Glaser, 2006, verändert).

Im Prinzip besteht ein circadianes System aus drei Komponenten: Input – endogener Oszillator – Output (Abb. 1.1). Zeitgeber gelangen als Input über Rezeptoren zur endogenen Uhr und synchronisieren sie. Ohne exter-

ne Stimuli läuft diese frei. Als Output folgen rhythmische Verhalten (z. B. Lokomotoraktivität, Schlüpfrythmik) oder rhythmische physiologische Prozesse (z. B. Kerntemperatur, Hormonkonzentrationen).

Verschiedene Rhythmen können eventuell durch externe Faktoren direkt, ohne den Einschluss eines Schrittmachers, beobachtet werden. Bei dem als Masking bezeichneten Vorgang lösen z. B. plötzliches Licht, höhere Temperaturen oder soziale Kontakte biologische Rhythmen aus und überdecken möglicherweise die Auswirkungen einer Inneren Uhr (Mrosovsky, 1999).

## 1.1 Rhythmisches Verhalten bei der Honigbiene *Apis mellifera*

Bei der Honigbiene *Apis mellifera* besteht ein diurnales, rhythmisches Verhalten aus täglichen Sammelflügen, die sie mit ihrem Zeitgedächtnis auf die Blürrhythmen ihrer Nahrungsquellen – verbildlicht in der von Carl von Linné 1745 eingeführten Blumenuhr – und damit auf die je nach Pflanzenart tageszeitspezifische, optimale Verfügbarkeit von Nektar und Pollen abstimmt (z. B. von Frisch, 1976). Das erwähnte Verhalten betrifft allerdings nur einen Teil einer Kaste, die Sammelbienen (engl. *foragers*). Sie leben nach einem strengen diurnalen Rhythmus (Crailsheim et al., 1996; Moore et al., 1998; Klein et al., 2008), sind tagsüber aktiv und schlafen nachts in Gruppen am Rand der Bienenwaben mindestens sieben Stunden lang (Kaiser, 1988; Tautz, 2007). Die Königin, die am Anfang ihres Lebens nur einmal den Bienenstock verlässt, um sich mit zehn bis 15 Drohnen zu paaren – währenddessen ist sie streng rhythmisch –, ist in ihrer Eier legenden Phase rund um die Uhr aktiv und zeigt keinen diurnalen Rhythmus, genauso wie die sie pflegenden Stockbienen (Lindauer, 1952; Free et al., 1992).

Die Arbeitsteilung unter den Arbeitsbienen in einem Bienenstock ist prinzipiell altersabhängig. Direkt nach dem Schlüpfen reinigen die neuen Arbeiterinnen die ersten zwei Tage ihres adulten Daseins Wabenzellen. Im Alter von zwei bis elf Tagen sind sie mit der Brutpflege, d. h. mit Füttern und Versorgen der Larven beschäftigt oder begleiten und pflegen die Königin. Mit elf bis 20 Tagen kümmern sie sich um die Nahrungslagerung, nehmen Pollen und Nektar von den Sammelbienen entgegen, lagern die Nahrung und stampfen Pollen. Solange sie ausschließlich im temperaturregulierten und dunklen Bienenstock tätig sind, werden sie als Stockbienen bezeichnet (engl. *nurses*) und zeigen keinen circadianen Rhythmus (Crailsheim et al., 1996; Moore et al., 1998). Spätestens im Alter von drei Wochen entwickeln sie sich zu Sammelbienen und beschaffen Pollen, Nektar, Wasser und Propolis aus einem Umfeld von bis zu 100 km<sup>2</sup> (Lindauer, 1952; Seeley, 1995; Robinson, 1992). Moore et al. (1998) entdeckten jedoch Differenzen in der Geschwindig-

keit der Entwicklung. Daher unterschieden sie schnelle Genotypen (*fast genotypes*), die bereits mit vier bis acht Tagen rhythmisch wurden, von langsamen Genotypen (*slow genotypes*), die erst mit 16 bis 22 Tagen soweit waren.

Der Wechsel vom Entwicklungsstadium einer Stockbiene zu dem einer Sammelbiene ist mit dem Erscheinen des rhythmischen Verhaltens gekoppelt (Moore et al., 1998). Auch isolierte Stockbienen verhalten sich unter konstanten Bedingungen zunächst arrhythmisch, später streng rhythmisch, weswegen Bloch et al. (2001) auf die Entwicklung eines endogenen Aktivitätsrhythmus schlossen. Auch von Frisch (1976) und zahlreiche andere Forscher vermuteten bereits, dass dem tagesrhythmischen Aktivitätsverhalten der Sammelbienen eine endogene Uhr zugrunde liegt, da sie sich mithilfe ihres Sonnenkompasses orientieren und über ihre Tanzsprache stundenlang im dunklen Bienenstock den Weg zu einer Futterquelle weisen können (Marathontänzerinnen), währenddessen sie den weiteren Verlauf der Sonne exakt einberechnen.

Eine Arbeiterin durchläuft während ihrer altersbedingten Entwicklung nicht zwangsläufig jeden „Beruf“, vielmehr hängt die Berufsausübung zusätzlich von ihrem sozialen Umfeld ab. Ein Bienenvolk besitzt eine gewisse Plastizität, die es ihm erlaubt, optimal auf veränderte Bedingungen zu reagieren. Am eindrucksvollsten offenbart sich die Plastizität in einem Experiment von Bloch and Robinson (2001). Sie veränderten in Bienenstöcken das Verhältnis von Stock- zu Sammelbienen. Eine deutliche Reduktion der Stockbienen bewirkte, dass ein großer Teil der Sammlerinnen die Nahrungssuche abbrach, um sich wieder um die Brut zu kümmern. Diese zu Stockaufgaben zurückgekehrten Sammlerinnen zeigten trotz ihres Alters erneut ein arrhythmisches Verhalten. Werden dagegen Sammelbienen unter Dauerdunkel (DD) im Labor gehalten, bleiben sie circadian rhythmisch (Shemesh et al., 2007; 2010).

Auch arrhythmische Stockbienen können entgegen ihres Alters schon früher rhythmisch in ihrem Verhalten werden, wenn sie aus ihrem Bienenstock entfernt und in Käfigen voneinander isoliert gehalten werden – auch unter konstanten Bedingungen. Nichts an ihrer Aktivität verändert sich dagegen, wenn die Stockbienen, die im Stock rund um die Uhr aktiv sind, dort lediglich einem Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt werden (Shemesh et al., 2007). Das Verhalten der Honigbiene wechselt zwischen arrhythmisch und rhythmisch je nach sozialer Rolle in der Arbeitsteilung bzw. je nach sozialem Umfeld.

Die Plastizität im Verhalten befähigt ein eusoziales Bienenvolk, angemessen auf veränderte Situationen zu reagieren und sich optimal fortzupflanzen. Das bedarf einer gut entwickelten Kommunikation. Die Verständigung könnte theoretisch auf verschiedene Weisen erfolgen, so zum Beispiel chemisch (wie etwa über Pheromone), visuell, auditiv, taktil oder über Vibrationen.

Southwick and Moritz (1987) stellten fest, dass Sammelbienen ihre Rhythmen nur dann aufeinander abzustimmen vermögen, wenn ihnen untereinander taktiler Kontakt und Futteraustausch möglich sind, Sicht- und Luftkontakt reichen dafür nicht. Auch Shemesh et al. (2007) vermuten einen Faktor innerhalb der Kolonie, der bei der Synchronisation der Bienen eine Rolle zu spielen scheint, nämlich den Kontakt zur Brut. Stockbienen, die auf Waben mit Brut innerhalb des Stocks, jedoch ohne direkten Kontakt zur Königin und zu Sammelbienen gehalten werden, bleiben rund um die Uhr aktiv. Gleichaltrige Stockbienen, die sich innerhalb oder auch außerhalb des Stocks in brutlosen Wabenkäfigen aufhalten, sind tagsüber aktiver als nachts und zeigen robuste Oszillationen in ihren Uhrigen-mRNA-Levels (Shemesh et al., 2010; vgl. Kapitel 1.4). Die Signale, die den Wechsel zwischen circadianer und nicht circadianer Aktivität auslösen, liegen vermutlich im direkten Kontakt zur Brut. Um welche Substanzen es sich handeln könnte, ist unbekannt (Shemesh et al., 2010; Bloch, 2010). Vielleicht besteht die chronobiologische Plastizität in zeitlichen und räumlichen Veränderungen der Expression bestimmter Gene, die Rhythmen generieren (Bloch et al., 2003).

Auf der Suche nach Auslösern für das rhythmische Verhalten wurden auch das neuro-endokrine Juvenilhormon und Octopamin untersucht, die beide in jungen Bienen in niedrigeren Konzentrationen als in Sammelbienen vorkommen. Das Juvenilhormon, das bereits in der larvalen Entwicklung und der Häutung der Insekten eine wichtige Rolle spielt, hat je nach Entwicklungsstand des Tieres unterschiedliche Auswirkungen auf die Hypopharynxdrüse, die bei jungen Stockbienen Sekrete für das Larvenfutter („Bienenmilch“) produziert, bei Sammelbienen Enzyme für das Umwandeln von Nektar in Honig (Kubo et al., 1996). Trotz des altersbedingten Unterschieds konnten Bloch et al. (2002) in Versuchen mit künstlichen Juvenilhormongaben oder der Entfernung der Corpora allata, dem Speicherort des Juvenilhormons, keine Beeinflussung auf die aufgabenbezogene Plastizität des circadianen Rhythmus feststellen. Auch Octopamin oder Epinastin (Gegenspieler des Octopamins) zeigten keinen Effekt auf den Startpunkt des rhythmischen Verhaltens oder den Freilauf unter DD. Allerdings erhöhte bzw. veränderte sich die *per*-mRNA-Oszillation in Gehirnen jüngerer Bienen (vgl. Kapitel 1.4), was auf einen Einfluss von Octopamin auf die Expression dieses Gens hindeutet (Bloch and Meshi, 2007).

Eine große Rolle in der Kommunikation der Honigbiene spielen Pheromone. Selbst die Larven produzieren in ihren Speicheldrüsen Brutpheromone, unter denen sich auch das in der Königin gefundene QMP (*queens mandibular pheromone*) befindet (Review: Le Conte and Hefetz, 2008). Grozinger et al. (2003) fanden heraus, dass Pheromone die Expression von Genen regulieren können. QMP scheint den Übergang vom Ausführen von Stockaufgaben zur Sammeltätigkeit außerhalb des Stocks verzögern zu können. Synthe-

tisches QMP bewirkte ein signifikantes „*delay*“ in der Ontogenie des Sammelverhaltens und gleichzeitig einen niedrigeren Juvenilhormon-Titer. Auch die Brutpheromone unterdrücken die Juvenilhormon-Konzentrationen in Arbeiterinnen, wobei die Dosis die Wirkung bestimmt: niedrige Dosen stimulieren die Entwicklung des Verhaltens, hohe führen zu einem späteren Beginn des Sammelns (Review: Le Conte and Hefetz, 2008).

Der endogene, circadiane Lokomotor-Aktivitätsrhythmus der sammelnden Honigbiene ist unter Dauerdunkel (DD) im Labor kürzer als 24 Stunden mit im Mittel  $23,0 \pm 0,5$  Stunden (Moore and Rankin, 1985) und variiert von 21,8 bis 23,5 Stunden (Moritz and Sakovsky, 1991). Diese Varianz liegt wahrscheinlich in der genetischen Vielfalt einer Kolonie, da eine Königin ihre Eier mit Samen verschiedener Drohnen befruchtet. Für frisch geschlüpfte, zunächst arrhythmische Tiere, die unter DD gehalten werden und dann ab dem neunten Tag Rhythmus zeigten, beträgt die freilaufende Periodenlänge  $\tau$  22,6 Stunden und für direkt am Stock gefangene und in DD überführte Sammelbienen 22,8 Stunden (Review: Moore, 2001). Sammlerinnen zeigen unter Dauerlicht (LL) einen Freilauf ihres Sammelflugrhythmus von 23,4 bis 23,8 Stunden (Review: Moore, 2001), der entsprechende Freilauf ihres Lokomotor-Aktivitätsrhythmus unter LL im Labor beträgt durchschnittlich sogar  $24,8 \pm 1,1$  Stunden (Moore and Rankin, 1985). Die freilaufende Periodenlänge der Lokomotor-Aktivität der Sammelbiene ist also unter DD kürzer als unter LL (Moore and Rankin, 1985), was der Regel nach Pittendrigh and Daan (1976) entspricht, nach der Tiere, deren  $\tau$  unter DD kleiner als 24 Stunden ist, unter LL ihre Periodenlänge verlängern. In der Diskrepanz der zwei Verhaltensrhythmen sehen Moore and Rankin (1985) die Möglichkeit, dass bei der Biene zwei separate Uhren oder Uhrsysteme zugrunde liegen oder „ein komplexes System koppelnder und entkoppelnder Ereignisse zwischen einer [...] „*master clock*“ und mehrerer das Verhalten kontrollierender neuronaler Kreisläufe“ (Brady, 1981). Wie andere Organismen haben auch Bienen einen eingeschränkten Mitnahmebereich. Der Versuch, die Honigbiene durch Licht zu synchronisieren, versagt bei einem kürzeren LD-Zyklus als 20 und einem längeren als 26 Stunden (Beier, 1968). Die Aktivität der Sammlerinnen ist nicht über den ganzen Tag gleich ausgeprägt, vielmehr sind sie in der späten „Photophase“ besonders geschäftig (Moore and Rankin, 1985). Der Beginn ihrer Lokomotor-Aktivität korreliert weniger mit dem Anschalten des Lichts, als das entsprechende Ende mit dem Ausschalten. Moore and Rankin (1985) berichten auch von Tieren, die bereits vor Licht-an aktiv wurden.

## 1.2 Der schlafähnliche Zustand der Honigbiene

Schlaf wird in Säugetieren vor allem anhand koordinierter Muster der elektrischen Aktivität im Cortex mittels Elektroenzephalogramm (EEG) sowie typischer Verhaltensmuster definiert (Hendricks et al., 2000). Bei Invertebraten ist aufgrund des Fehlens einer Großhirnrinde und wegen des Exoskeletts kein EEG möglich. Dass es sich bei *Apis mellifera* tatsächlich um Schlaf bzw. einen schlafähnlichen Zustand und nicht nur um eine inaktive, bewegungslose Ruhestellung handelt, konnten Kaiser (1988) und Sauer et al. (2003) anhand beobachteter Verhaltenskriterien darlegen. Kennzeichnend für den Schlaf der Honigbiene sind ein deutlich reduzierter Muskeltonus im Körper und im Nacken, was zu einer typischen Körperhaltung führt, außerdem Zeiten von Antennenbewegungslosigkeit zusammen mit einem charakteristischen Hängenlassen der Antennenglieder, ein deutlich erhöhter visueller und thermischer Reaktionsschwellenwert (nach Eban-Rothschild and Bloch (2008) visuell bis zu 10000-fach höher in Schlafphase 3 (siehe unten) relativ zu einer wachen, bewegungslosen Biene), eine reduzierte Körpertemperatur und letztendlich ein speziell zum Schlafen aufgesuchter Ort (Kaiser, 1988). Der Schlaf ist nach Sauer et al. (2003) bei der Honigbiene ein dynamischer Prozess, da die einzelnen Charakteristika unterschiedliche Intensität erfahren und in irregulären Intervallen während des Schlafs spontane Antennenbewegungen zu registrieren sind. Schlaf-Deprivation führt zudem in der folgenden D-Phase zur Intensivierung und wird so kompensiert (Sauer et al., 2004); einer anderen Studie zufolge wird sie dagegen in der L-Phase ausgeglichen (Hussaini et al., 2009). Auftretende Ventilationsbewegungen sind während der tiefsten Schlafphase, bei der Biene sieben Stunden nach Schlafbeginn, am geringsten, was im Kontrast zum Schlaf des Menschen steht. Alle diese Kriterien erfüllen die in Campbell and Tobler (1984) sowie Hendricks et al. (2000) genannten Anforderungen, als schlafähnlicher Zustand bei bestimmten Invertebraten zu gelten. Neben dem Argument einer Ruheperiode mit spezieller Haltung (bedingt durch eine reduzierte Bewegungsaktivität), einem eigens dafür aufgesuchten Schlafplatz, einem erhöhten Weckschwellenwert und der Reversibilität kommt die homöostatische Regulation hinzu, die sich nach längerem Wachsein in einer Erhöhung des Schlafdrucks auswirkt.

Eban-Rothschild und Bloch (2008) verglichen die Schlafarchitektur von maximal drei Tage jungen Stockbienen und mindestens drei Wochen alten Sammelbienen im Labor. Sie konnten drei Schlafstadien feststellen, wobei das erste die leichteste und das dritte die tiefste Phase darstellen. Bei beiden Altersgruppen wurde der Schlaf gleich häufig durch Wachphasen unterbrochen. Abweichungen in der Schlaf-Architektur der beiden Arbeitergruppen lagen darin, dass die jüngeren Tiere häufiger die Schlafstadien wechselten sowie länger in der ersten Phase verweilten. Ähnlich der Säugetiere scheint sich der Schlaf

altersbezogen zu entwickeln. Der größte Unterschied besteht darin, dass Stockbienen immer wieder über die ganzen 24 Stunden verteilt schlafen, wohingegen Sammelbienen vorrangig nachts und in Schlafgruppen schlafen. In der Vor-Sammelbiene (*pre-forager*) häufen sich die Ruhephasen in der Nacht im Vergleich zum Tag, in der sie bewegungslos verharnt (Moore et al., 1998). Klein et al. (2008) verglichen in ihrer Untersuchung über den Schlaf der Honigbiene vier verschiedene Arbeiterstadien: „*cell cleaner*“, „*nurse*“, „*food storer*“ („*middle-aged bees*“) und „*forager*“. Bereits bei den Futterlagerinnen konnten sie die Entwicklung eines 24-Stunden Schlaf-Wachrhythmus erkennen.

### 1.3 Lokalisation der Inneren Uhr

Bei Tieren gibt es meist eine Hauptuhr (*master clock*), die im Gehirn bilateral in jeder Hemisphäre zu finden ist und aus Schrittmacherneuronen besteht. Diese Zellen differenzieren sich in ihrer Morphologie, Physiologie und ihren Neurotransmittern. Dadurch kommen ihnen unterschiedliche Funktionen zu wie Licht-Input, interzelluläre Kommunikation zwischen den Zellen einer „*master clock*“ oder denen beider Hemisphären sowie die Weiterleitung des circadianen Signals in andere Gehirnbereiche (Helfrich-Förster, 2004).

Bei Säugetieren ist die „*master clock*“ im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN) des Hypothalamus in unmittelbarer Nähe des optischen Chiasmas lokalisiert (Weaver, 1998; Repert and Weaver, 2001) und besteht je nach Tierart aus etwa 10000 bis 50000 Neuronen. Bei den meisten Insekten wie beispielsweise der Taufliege *Drosophila melanogaster* oder der Schabe *Leucophaea maderae* befindet sie sich in der akzessorischen Medulla, einem kleinen Neuropil, das ventromedian an der Medulla hängt (Details siehe unten und in Kapitel 1.5.2). Sie umfasst im Gehirn der Taufliege etwa 150 (Helfrich-Förster, 2004; Helfrich-Förster et al., 2007a) und in dem der Schabe etwa 250 assoziierte Neurone (Stengl and Homberg, 1994; Reischig and Stengl, 2003b).

Das circadiane Schrittmachersystem besteht bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* aus mehreren Hauptgruppen an Neuronenclustern, die nach ihrer anatomischen Lage im Protocerebrum benannt werden (Abb. 1.2, S. 8). Man unterscheidet die dorsal liegenden Dorsalneurone (DN), die wiederum in drei Cluster unterteilt werden (DN<sub>1-3</sub>), von den ventral zu findenden Lateralneuronen (LN), die unter anderem in eine ventrale und dorsale Gruppe untergeordnet werden (LN<sub>v</sub> und LN<sub>d</sub>). Aufgrund der Zellgröße gliedern sich die LN<sub>s</sub> in kleine s-LN<sub>s</sub> und große l-LN<sub>s</sub> (*small* und *large*) (Review: Peschel and Helfrich-Förster, 2011).



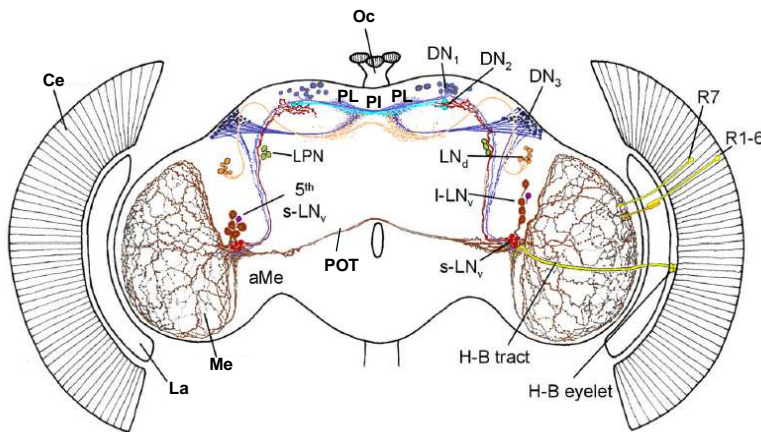


Abb. 1.2: Das circadiane Schrittmachersystem im Gehirn von *D. melanogaster*. Rot und dunkelrot dargestellt sind die LN<sub>v</sub>s, die u. a. PDF exprimieren. Die s-LN<sub>v</sub>s projizieren über die ipsilaterale akzessorische Medulla (aMe) ins dorsale Protocerebrum, die I-LN<sub>v</sub>s sowohl in die ipsilaterale Medulla (Me) als auch über den posterioren optischen Trakt (POT) nach kontralateral. Weitere Abk.: Ce = Komplexauge (compound eye); La = Lamina; Oc = Ozellen; PI / PL = Pars intercerebralis / P. lateralis (Abb. aus und nach Helfrich-Förster et al., 2007a).

Die Uhrneurone, vor allem die PDF-Neurone („Pigment Dispersing Factor“, Kapitel 1.5.2), projizieren hauptsächlich in die akzessorische Medulla, die wie schon erwähnt als Hauptschrittmacherzentrum zählt, aber nicht vergleichbar der Schabe strukturiert ist (siehe unten). Zudem erfolgt die Projektion ins dorsale Gehirn, das viele Verbindungen in die meisten

Gehirnbereiche zeigt. Dort befinden sich auch die Pars intercerebralis und lateralis, die als hormonelle Zentren gelten (z. B. Helfrich-Förster, 2004; Helfrich-Förster et al., 2007a; Homberg et al., 2003).

Neben dem Haupttaktgeber existieren in vielen Geweben und Organen periphere circadiane Uhren, die zwar bei Fliegen lichtabhängig synchronisiert werden können, aber ohne die „master clock“ langfristig desynchronisieren. Rhythmische Aktivität von Uhrgenen (in erster Linie „period“ (*per*), vgl. Kapitel 1.4) und ihrer Produkte finden sich bei *D. melanogaster* beispielsweise in den visuellen Photorezeptoren, aber auch im Darm, in Exkretionsorganen (den Wandungen der Malphigischen Gefäße), in den Antennen oder in den prothorakalen Drüsen (Giebultowicz, 2001).

Bei der Schabe *Leucophaea maderae* ist das circadiane Schrittmacherzentrum in der akzessorischen Medulla (vgl. Kapitel 1.5.2), die von Reischig and Stengl (2003b) detailliert charakterisiert wurde, lokalisiert. Im Gegensatz zu anderen optischen Neuropilen ist sie nicht retinotop organisiert, weist aber einen strukturierten Aufbau auf. Das kleine Anhängsel der Medulla besteht aus einem nodularen Kern, der den Haupt-Input, bestehend aus vor allem GABA-ir Fasern ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), aus der ipsilateralen Medulla über den distalen Trakt erfährt. Desweiteren enthält sie ein internodulares und peripheres Neuropil (Schale) sowie ein anteriores Fasernetzwerk. Der Lobula-Valley-Trakt (LVT), der mit dem internodularen und peripheren Neuropil verbunden ist, führt ipsi- und kontralaterale Fasern und sorgt für koppelnden In- und efferenten Output. Das Neuropil wird von zahlreichen Neuronen mit unterschiedlichsten Neurotransmittern, darunter auch PDF, innerviert (Reischig and Stengl, 2003b; Homberg et al., 2003).

Bei der Biene *Apis mellifera* sind die mutmaßlichen circadianen Schrittmacherneurone sowie die anatomische Organisation der circadianen Uhr noch nicht detailliert beschrieben (Review: Bloch, 2010). Wie bei anderen Tieren wird der zentrale Schrittmacher, der das lokomotorische Aktivitätsverhalten kontrolliert, im Gehirn vermutet. Bloch et al. (2003) färbten Honigbienengehirne immunhistochemisch mit PER- und PDH-Antikörpern. Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle im circadianen Zeitsystem vieler Insekten (PERIOD-Protein (PER) siehe Kapitel 1.4; Pigment-Dispersing Hormone (PDH) 1.5). Intensive zytoplasmatische PER-Färbung konnte die Arbeitsgruppe pro Gehirn maximal in acht Neuronen zwischen Pedunculus und Calyces erkennen (anatomische Lage der Neuropile siehe Kapitel 3.3.2, S. 83): pro Hemisphäre anterior innerhalb der Pars lateralis drei bis maximal vier große, eher eng bis aneinander angrenzend liegende (APER-L für „*anterior PER-ir lateral neurons*“) und im gleichen Ausschnitt, aber deutlich tiefer im Gehirn eine bis zwei kleine, verstreut liegende Zellen (DPER-L für „*deep PER-ir lateral neurons*“) (siehe auch Eban-Rothschild and Bloch, 2012). Ein bedeutender Unterschied zu *D. melanogaster* liegt darin, dass bei der Biene – wie auch bei der Hummel *Bombus terrestris* (Weiss et al., 2009) – nur das Zytoplasma und nicht zusätzlich der Nukleus gefärbt ist. Auch der Ort der PER-Neurone weicht deutlich von dem im Taufliedengehirn ab. Zudem zeigte sich eine schwache PER-Färbung in Zellen am inneren Laminarand, die in einem halbmondförmigen, tangentialen Band aus kleinen Zellen organisiert sind. Da keine Unterscheidung von den Gliazellen möglich war, bekamen diese Zellen keine Namen zugewiesen. Außerdem fanden sich im gesamten Gehirn viele Zellpopulationen mit PER-Färbung im Kern und/oder schwacher nicht-punktierter zytoplasmatischer Färbung.

Die Anzahl der APER- und DPER-L-Neurone war in der subjektiven Nacht prinzipiell größer als am Tag, zusätzlich in älteren Bienen höher als in jungen. Auch die Färbintensität erschien in älteren Bienen ausgeprägter. In den optischen Loben und den übrigen Zellen konnten Bloch et al. (2003) eine entsprechende circadiane Oszillation feststellen, jedoch ohne einen Altersunterschied. In den seltenen Fällen, in denen Fortsätze schwach zu sehen waren, schienen sie nach kontralateral zu projizieren.

Závodská et al. (2003) dagegen fanden lediglich drei PER-positive Zellen im dorso-lateralen Protocerebrum mit schwach in „dots“ gefärbten Fasern in Richtung optische Loben. Diese Färbungen beruhen auf anti-PER57 und anti-PER58 Antikörpern (Antigen *Antheraea pernyi* PER, Quelle: Antibody 57/10w und 58/10w von Sauman and Reppert (1996)), Bloch et al. (2003) dagegen verwendeten Hall #16 (Liu et al., 1992) und Young's anti-PER (Vosshall and Young, 1995). Mit Reppert's 58/10w konnten sie keine Färbung in den optischen Loben oder übrigen Zellen mit Kernfärbung feststellen.

Im Gegensatz zu *D. melanogaster* sind PER und PDF in Bienen-Neuronen nicht kolokalisiert (Helfrich-Förster, 1995; Bloch et al., 2003). Eine einführende Beschreibung der PDF-Neurone und ihrer Projektionen im Gehirn von *Apis mellifera* befindet sich in Kapitel 1.5.2.

## 1.4 Molekulare Grundlagen der Inneren Uhr

Zur experimentellen Untersuchung werden in der Chronobiologie der Zeitpunkt, an dem das Licht (im Labor) angeschaltet wird, als „Zeitgeber Time“ Null (ZT0), der, an dem es ausgeschaltet wird, als ZT12 definiert. Ein Tag mit 12 Stunden Licht (L) und 12 Stunden Dunkelheit (D) erhält die Bezeichnung LD 12:12 und gilt für die folgende Beschreibung.

Charakteristischerweise enthalten Schrittmachernerneurone sogenannte Uhrgene, die rhythmisch exprimiert werden. Die Produkte dieser Gene wiederum hemmen sich zeitverzögert selbst über negative Rückkopplungsschleifen. Vereinfacht dargestellt besteht ein solches molekulares Uhrwerk bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* aus den Uhrgenen *timeless* (*tim*), *period* (*per*), *Clock* (*Clk*) und *cycle* (*cyc*) (Review: Peschel and Helfrich-Förster, 2011). Zwei dieser Uhrgene, *per* (Konopka and Benzer, 1971) und *tim* (Sehgal et al., 1994), werden im Zellkern in ihre messenger-RNA (mRNA) transkribiert. Dazu nötig sind die beiden Proteine CYC und CLK, die als Transkriptionsfaktoren an die E-Boxen der *tim*- und *per*-Gene binden und sie somit „anschalten“ (Rutila et al., 1998; Allada et al., 1998). Im Zytoplasma kommt es schließlich zur Translation der *tim*- und *per*-mRNA (deren Konzentrationen erhöhen sich kontinuierlich bis zu ihrem Maximum am Abend, etwa ZT14) in ihre Proteine TIM und PER. Die Akkumulation dieser Proteine findet jedoch zeitverzögert statt, da TIM unter Licht durch den Blaulicht-Photorezeptor Cryptochrom (CRY) degradiert wird (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998; Ceriani et al., 1999). CRY ist ein Flavoprotein, das durch Licht eine Konformationsänderung erfährt. Das derartig aktivierte CRY kann nun an TIM binden und dieses degradieren. Erst in der Nacht (bis ca. ZT18/19) reichert sich TIM daher in höheren Konzentrationen an. PER dagegen kann nur akkumulieren, wenn es durch TIM stabilisiert wird, da es ansonsten von der Proteinkinase DOUBLE-TIME (DBT) phosphoryliert und somit über die Ubiquitinierung in Proteasomen abgebaut wird (Price et al., 1998).

Der TIM/PER/DBT-Komplex gelangt schließlich in den Zellkern, wo er an das Heterodimer CYC/CLK bindet (über PER und CLK). CLK wird hyperphosphoryliert, dadurch entfernen sich die Transkriptionsfaktoren von der Promotorregion und die Gene *tim* und *per* werden nicht mehr abgelesen. Die Produkte TIM und PER hemmen damit ihre eigene Transkription, ein Vorgang, der als negative Rückkopplung bezeichnet wird. Ab ZT0 aktiviert das Licht CRY, welches TIM degradiert. Infolgedessen wird PER nicht mehr stabilisiert und

wie oben beschrieben durch DBT abgebaut. Das Licht startet folglich als exogener Zeitgeber einen neuen Zyklus der molekularen Uhr.

Eine zweite Rückkopplungsschleife greift in die erste ein, indem es die Transkription des Gens *Clk* reguliert. *Cyc* wird nicht rhythmisch exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren CYC/CLK binden nicht nur an die E-Boxen von *tim* und *per*, sondern auch an die zweier weiterer Gene: *vrille*, kurz *vri* (Blau and Young, 1999) und *PAR domain 1ε*, kurz *Pdp1ε* (Cyran et al., 2003). Das im Zytoplasma translatierte und in den Zellkern zurückgewanderte VRI inhibiert die Transkription des *Clk*-Gens, indem es sich an dessen Promotorregion heftet. Hohe Konzentrationen an *Clk*-mRNA erscheinen reziprok zur *tim/per*-mRNA am späten Abend und frühen Morgen. Allerdings aktiviert *Pdp1ε* dessen Transkription. Genauer über die Funktion von *Pdp1ε* ist noch nicht geklärt (Review: Peschel and Helfrich-Förster, 2011). Für eine detailliertere Beschreibung des molekularen Uhrwerks wird auf das Review von Peschel and Helfrich-Förster (2011) verwiesen.

Bei der Maus findet ein ähnlicher „*feedback loop*“ statt wie bei der Fliege, mit den hauptsächlichsten Unterschieden, dass anstelle des TIM-Proteins CRY und anstelle von CYC das Maus-Homolog BMAL1 steht. Außerdem fördert Licht die *per*-Transkription, synchronisiert also die Innere Uhr, aber über einen anderen Mechanismus (Helfrich-Förster, 2004).

Bei der Biene konnte als Erstes ein Homolog des Uhrgens *period* (*per*) entdeckt werden (Toma et al., 2000). Die *per*-Expression hängt vermutlich vom Entwicklungsstand der Biene ab, ein Tag alte Bienen weisen grundsätzlich die niedrigsten Gesamtkonzentrationen an *per*-mRNA auf, die älteren Sammelbienen die höchsten (Bloch et al., 2004). Sammelbienen, die in den Bienenstock zurückkehren und dort wieder Stockaufgaben übernehmen (siehe Kapitel 1.1), besitzen gleiche Levels wie ihre sammelnden Altersgenossinnen. Relativ junge, frühreife Tiere, die aber mit ihren acht bis zehn Tagen bereits sammeln, zeigen gleiche *per*-mRNA-Mengen wie 23 bis 25 Tage alte Sammlerinnen (Bloch et al., 2001). Daher postulierten Bloch et al. (2004) für drei Entwicklungsstadien. Im ersten Stadium sind die Jungbienen arrhythmisch. Im nächsten Stadium vermögen sie ihre Aktivität mithilfe des Lichts zu synchronisieren, sind aber im DD noch nicht in der Lage, einen endogenen Rhythmus aufrechtzuerhalten. Im dritten und letzten Stadium verhalten sie sich schließlich sowohl unter LD als auch unter DD rhythmisch.

Untersuchungen, ob die *per*-Expression durch äußere/diverse Faktoren beeinflusst wird, ergaben, dass weder Licht, Flugeraufnahme, Koloniegöße noch die Demografie diese veränderten (Bloch et al., 2004).

Im Zeitverlauf registrierten Bloch et al. (2003) und Toma et al. (2000) Veränderungen in den Konzentrationen der *per*-mRNA (Abb. 1.3, S. 13). Im Sammelbienenhirn oszilliert die relative Konzentration an *per*-mRNA signifikant über die Zeit (Bloch et al., 2001; Shemesh et al., 2007; Rubin et al., 2006), wobei die höchsten Konzentrationen in der Nacht auftreten und bis zu dreimal höher als der Tagestiefpunkt ausfallen. Die im Stockbienenhirn dagegen „*cycelt*“ (in frühreifen „*pre-foragers*“) oder oszilliert nicht (in normalen Stockbienen), je nach sozialem Umfeld. Bei klassischen Stockbienen verändert sich also der relative *per*-mRNA-Level über die Zeit nicht.

Eine Untersuchung des Honigbienen-Genoms zeigte keine Orthologe zum drosophiliden *cry* (*insect cry1*) und *tim1* (Velarde et al., 2005; Rubin et al., 2006). Anstelle des *Drosophila-cry* entdeckten Rubin et al. (2006) ein Ortholog zu dem Säuger-*cry* (*insect cry2*), das als Transkriptions-Repressor beschrieben wird und im Gegensatz zu *Drosophila* nicht lichtsensitiv ist (Yuan et al., 2007; Bloch, 2010). Daraus folgt, dass der Licht-Input wahrscheinlich über einen anderen Weg als über den Blaulichtrezeptor bei der Taufliede oder das retinale Melanopsin bei Säugern abläuft.

In diesem Zusammenhang könnte das von Velarde et al. (2005) entdeckte, nicht-visuelle Pteropsin eine Rolle spielen. Es ist näher verwandt zu den visuellen Opsinen der Vertebraten als zu den Invertebraten-Opsinen. Pteropsin konnte nicht bei *D. melanogaster* gefunden werden. Bei der Honigbiene wird es weder im Komplexauge noch in den Ozellen exprimiert, sondern ausschließlich in einem aus 12 Zellen bestehenden Cluster. Dieser Zellcluster liegt in jeder Hemisphäre an der Grenze zwischen dem lateralen Protocerebrum und der Medulla des optischen Lobus. In diesem Bereich befinden sich auch die von Bloch et al. (2003) und Závodská et al. (2003) immunhistochemisch gefärbten PDF-Zellen (Kapitel 1.5.2), weswegen eine Rolle in der Regulation der circadianen Uhr erwägt wird. Genaues müssen jedoch erst weitere Versuche ergeben (Velarde et al., 2005).

Das Genom der Honigbiene enthält weitere Orthologe für *cyc*, *Clk*, *tim2*, *vri* und *Pdp1* sowie vermutliche Bindungsstellen für VRI und PDP1 „*upstream*“ vor den Startcodons von *clk* und *cyc* (Rubin et al., 2006). Der zeitliche Verlauf der Konzentrationen an mRNA in Sammelbienen beschreibt eine beinahe identische Oszillation für *per* und *cry* mit einem gemeinsamen Maximum in der ersten Hälfte der Dunkelphase (Abb. 1.3, S. 13). Die *cry*-mRNA schwingt wie *per*- statistisch signifikant und hat aber einen bis zu sechsmal höheren nächtlichen Peak im Vergleich zu seinem Tagesminimum (*per*-mRNA nur dreimal höher, ist dem Schema nicht zu entnehmen). In Antiphasse dazu *cycelt* – wie bei der Maus – statistisch signifikant *cyc* mit einem leichten Peak (bis 1,9 mal höher als „Mulde“) am Ende der Dunkelphase, ein gleichbleibendes Transkriptionsniveau behält *Clk* bei. Die schema-

tische Darstellung bezieht sich auf relative mRNA-Level im Gehirn von circadianen Bienen, und zwar sowohl unter LD als auch unter DD (Rubin et al., 2006).

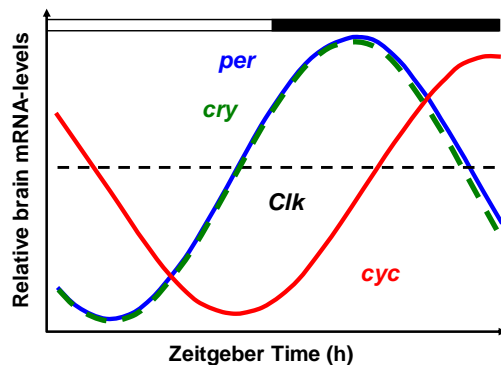


Abb. 1.3: Schematisiertes Modell für die relativen, molekularen Uhr-gen-mRNA-Oszillationen im Gehirn von Sammelbienen. *Per*- und *cry*-mRNA oszillieren signifikant mit ihrem gemeinsamen Maximum in der frühen Nacht und ihrem Minimum am frühen Tag. *Cyc* schwingt in Antiphase dazu. Gleichbleibende Konzentrationen zeigt *Clk*. Der Verlauf ist gleich für LD und DD (Abb. nach Rubin et al., 2006 und Bloch, 2010; verändert).

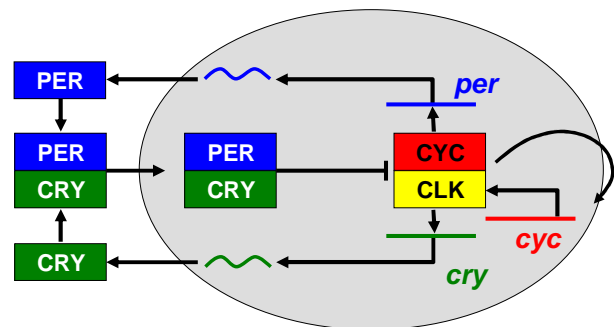


Abb. 1.4: Schematisches Modell des molekularen Uhrwerks bei der Honigbiene.

Die Proteine PER und CRY hemmen ihre eigene Transkription über die negative Rückkopplung. CYC scheint der oszillierende Faktor in dem positiven Glied der Schleife zu sein und mit CLK zusammen als Transkriptionsfaktoren für *per* und *cry* zu agieren (nach Rubin et al., 2006 und Bloch, 2010; verändert).

Anhand der aufgeführten Daten wurde ein erstes Modell für das molekulare Uhrwerk der Honigbiene *Apis mellifera* vorgeschlagen, das auf den Kenntnissen der drosophiliden Uhr beruht (vereinfacht dargestellt in Abb. 1.4). Das Schema demonstriert, dass *per* und *cry* zusammen, ähnlich wie *per* und *tim* bei *D. melanogaster*, ihre eigene Transkription über eine negative Rückkopplung hemmen. Die positiven Elemente scheinen VRI und PDP1 mit dem oszillierenden Faktor *cyc* zu sein (Bloch, 2010).

Nicht enthalten in den Schemata ist *tim2*, da seine Oszillationsmuster in verschiedenen, aber auch gleichen Ansätzen nicht konsequent gleich erscheinen. Die mRNA-Konzentration schwingt bei Sammelbienen meist unter LD analog zu *per* und *cry* und unter DD eher entsprechend zu *cyc*, bei Stockbienen unter LD jedoch nicht. Daher wird an dieser Stelle ein Einfluss auf die Expression sowohl von der Umwelt, speziell dem Licht, als auch von der circadianen Uhr vermutet. In den Licht-Input könnte also ebenfalls TIM2 involviert sein (Rubin et al., 2006; Shemesh et al., 2007; Bloch, 2010).

Bei arrhythmischen Stockbienen bleiben die Konzentrationen aller untersuchten Uhr-gen-mRNAs über die Zeit auf etwa gleichem Niveau (Toma et al., 2000; Bloch et al., 2001; Shemesh et al., 2007). Auch bei Sammelbienen, die aufgrund der Demografie zu Stockaufgaben und zur Arrhythmizität zurückkehrten (Bloch and Robinson, 2001), dämpfen sich die mRNA-Oszillationen der Uhr-gene wieder auf das Verlaufsmuster bei Stockbienen (Bloch et al., 2001). Licht kommt als exogener Zeitgeber nicht in Frage, da sich bei Stockbienen trotz eines LD-Wechsels an ihrer Aktivität nichts ändert und „umgekehrt“ Sammelbienen, wenn sie in DD überführt werden, circadian rhythmisch bleiben (vgl. 1.1). Zudem

werden auch Stockbienen, die vom Bienenstock isoliert werden, rhythmisch, obwohl ihre Altersgenossinnen rund um die Uhr aktiv bleiben (Shemesh et al., 2007). Das lässt darauf schließen, dass das circadiane System der Stockbienen zwar ein rhythmisches Verhalten generieren kann, dieses aber im Umfeld der Kolonie nicht exprimiert wird (Shemesh et al., 2007). Bestärkt wird die Hypothese durch die Tatsache, dass frisch geschlüpfte Stockbienen in der Isolation schon im Alter von drei bis 14 Tagen rhythmisch werden, während gleichaltrige Bienen rund um die Uhr mit der Brutpflege beschäftigt sind (Moore, 2001).

Als Ursache für die Plastizität nennen Shemesh et al. (2007) drei Möglichkeiten. Zum einen könnte die Uhr durch äußere Einflüsse maskiert sein. Zum anderen ist es möglich, dass sie vom Verhaltensoutput entkoppelt wird. Und schließlich könnte die Plastizität auch in einer echten Plastizität des Uhr-Systems liegen. Alle Untersuchungen deuten darauf hin, dass soziale Faktoren die Arbeitsteilung beeinflussen und wichtig für die Regulation der Inneren Uhr sind. Shemesh et al. (2007) schlossen aus den Ergebnissen, dass es sich bei der Plastizität um eine echte Reorganisation des circadianen Systems handelt, das je nach unterschiedlicher Aufgabe innerhalb der Arbeitsteilung oszilliert oder nicht. Das Fehlen von Oszillationen bei Stockbienen und zu Stockaufgaben zurückgekehrten Sammelbienen spricht gegen die Masking- und Entkopplungshypothese.

## 1.5 Pigment-Dispersing Factor (PDF)

### 1.5.1 Grundlegendes zu PDF

Ursprünglich wurde das „*Pigment-Dispersing Hormone*“ (PDH) bei Crustaceen entdeckt, wo es mit seinem Antagonisten „*Red Pigment-Concentrating Hormone*“ (RPCH) die Pigmentbewegungen in den Chromatophoren des Integuments sowie die lichtabhängige Verteilung der retinalen Schirmpigmente im Komplexauge steuert (Rao and Riehm, 1988; Rao, 1992). Zusätzlich scheint es die Sensitivität bei elektrischen Antworten auf photische Stimulationen zu regulieren (Review: Meelkop et al., 2011).

Ein Antiserum, das gegen PDH in Crustaceen gerichtet ist (Dircksen et al., 1987), erkennt in Insekten ein Homolog zu PDH. Dieses kann als Peptidextrakt in den Chromatophoren der Krabbe *Uca pugilator* die Pigmente verteilen und wurde deshalb „*Pigment-Dispersing Factor*“ (PDF) genannt (Dores and Herman, 1981; Review: Meelkop et al., 2011). Antikörper gegen das Crustaceen PDH kreuzreagieren mit PDF in den meisten Insekten, so zum Beispiel in der holometabolen *Drosophila melanogaster* (Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Park and Hall, 1998) oder der hemimetabolen *Leucophaea maderae* (Stengl and Homberg, 1994).

Bei PDF handelt es sich um ein aus 18 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid (Octadecapeptid), dessen Aminosäuresequenz sich in den verschiedenen Insekten, in denen es detektiert wurde, überwiegend identisch ist und nur in wenigen Aminosäuren variiert (Review: Meelkop et al., 2011). Neuropeptide kommen beinahe im gesamten Tierreich vor, von den Hydrozoen bis zu den Säugern. Allgemein werden sie in tierischen circadianen Uhren als Signalmoleküle eingesetzt (Maywood et al., 2006; Nässel and Homberg, 2006). Dabei verstärken sie die Oszillationen innerhalb der „*master clock*“, synchronisieren einzelne Uhrneurone untereinander und übertragen die circadianen Signale zu „*downstream*“, in anderen Gehirnbereichen liegenden Neuronen (Helfrich-Förster, 2005).

Während der Synthese werden zunächst im Cytoplasma größere Vorläuferproteine (Precursorproteine, Preproproteine), die im Genom codiert sind, gebildet, aus denen schließlich mehrere verschiedene Neuropeptide hervorgehen können (Nässel, 2006; Review: Meelkop et al., 2011).

Gespeichert werden die Signalmoleküle in Vesikeln, in denen sie zu ihrem Freisetzungsort transportiert werden. Dort, in der Synapse oder in Varikositäten, führt bei Bedarf eine Depolarisation zur Exocytose der Signalmoleküle in den extrazellulären Raum. PDF, gepackt in „*dense core vesicles*“, akkumuliert in den Varikositäten und seine Freisetzung erfolgt parakrin (z. B. bei *Musca domestica* und *Drosophila melanogaster*: Miśkiewicz et al., 2004; 2008; bei *Leucophaea maderae*: Reischig and Stengl, 2003b). Im extrazellulären Raum binden die Signalmoleküle an ihre Rezeptoren an der Zielzellmembran. Hyun et al., Mertens et al. und Lear et al. (alle 2005) identifizierten bei *Drosophila* für PDF einen G-Protein-gebundenen Rezeptor (GPCR, engl. *G-protein-coupled receptor*) der Unterfamilie B1, der zu den klassischen Hormonrezeptoren gehört. Die Bindung eines Neuropeptids an seinen Rezeptor löst in der Zielzelle eine intrazelluläre Signaltransduktion aus. Hierbei interagiert der aktivierte GPCR mit Effektorproteinen, die Ionenkanäle oder Enzyme sein können. Bezüglich PDF aktiviert der Rezeptor eine Adenylatzyklase. Die Enzyme katalysieren schließlich die Bildung sekundärer Messenger (z. B. cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ ), die wiederum verschiedene Enzyme (z. B. Proteinkinasen) stimulieren oder zur Öffnung bzw. Schließung von Ionenkanälen führen können. In Bezug auf PDF konnten Hyun et al. (2005) intrazellulär eine Zunahme der cAMP-Synthese feststellen (Helfrich-Förster, 2005; Nässel, 2002; Nässel and Homberg, 2006).

Die Rezeptoren befinden sich bei *D. melanogaster* auf den PDF-exprimierenden s-LN<sub>v</sub>s und nicht oder in sehr geringem Ausmaß auch auf den l-LN<sub>v</sub>s sowie auf den meisten nicht-PDF-exprimierenden Uhrneuronen (Im and Taghert, 2010). Erstere und Letztere reagieren auf PDF mit einer lang andauernden, starken Erhöhung der cAMP-Konzentration (Shafer et al., 2008). Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, dass PDF als ein direkter



Modulator der meisten Neurone im Uhrnetzwerk der Taufliede fungiert. Die Tatsache, dass die s-LN<sub>v</sub>s selbst PDF-Rezeptoren tragen, deutet auf die autorezeptive Möglichkeit hin. Neuerdings wurden PDF-Rezeptoren zudem auf nicht-Uhrneuronen und nicht-neuronalen Zellen im visuellen System gefunden, auf die die l-LN<sub>v</sub>s zu zielen scheinen (Im and Taghert, 2010). Diese befinden sich auf bisher nicht identifizierten Zellen nahe der Fenstermembran (*fenestrated membrane*) an der Basis der Retina. Daher vermuten Im and Taghert (2010), dass „PDF einen visuellen Input zur circadianen Uhr über die Regulation von nicht-neuronalen Elementen“ modulieren könnte.

Für die Signalbeendigung wird PDF durch Peptidasen abgebaut oder zusammen mit dem Rezeptor internalisiert (Nässel, 2002).

### 1.5.2 Die PDF-Neurone und ihre Lage in ausgewählten Insektengehirnen

Mit anti-PDF färbten Závodská et al. (2003) Gehirne aus zahlreichen Insektenklassen. Dabei entdeckten sie das Neuropeptid bei beinahe allen untersuchten Vertretern überwiegend in Zellclustern frontal und nahe der Medulla. Detailliert wurde PDF bei mehreren Spezies immunhistochemisch detektiert, so z. B. bei *Drosophila melanogaster* (Helfrich-Förster and Homberg, 1993), *Leucophaea maderae* (Stengl and Homberg, 1994) und *Apis mellifera* (Bloch et al., 2003).

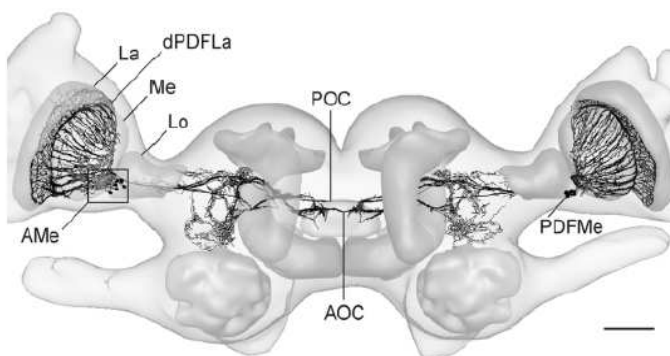


Abb. 1.5: Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Schabe *Leucophaea maderae* (aus Homberg et al., 2003). Beschreibung siehe Text. Messbalken 200 µm.

Die PDF-Neurone erfüllen bei *Drosophila* (Helfrich-Förster and Homberg, 1993) als auch bei *Leucophaea* (Stengl and Homberg, 1994) die in den beiden Veröffentlichungen publizierten anatomischen Kriterien, um als circadiane Schrittmacherneurone zu gelten: die Lage der Somata ventral zwischen Medulla und Lobula (Abb. 1.2, S. 8

und Abb. 1.5), die Verzweigungen der Neurone in die akzessorische Medulla, die Projektionen in die Lamina und in verschiedene Gebiete des mittleren Protocerebrums – eingeschlossen die dortige Überlappung mit neurosekretorischen Zellen und absteigenden Neuronen – sowie die Verbindungen über Kommissuren mit den kontralateralen PDF-Neuronen, die die beidseitigen Schrittmacherneurone koppeln.

Im Gehirn der holometabolen, adulten *Drosophila melanogaster* exprimieren nicht alle Uhrneurone PDF. PDF-positiv sind vier s-LN<sub>v</sub>s, die sich in die akzessorische Medulla (siehe Kapitel 1.3 und Abb. 1.2, S. 8) und ins dorsale Protocerebrum verzweigen. Die fünfte s-LN<sub>v</sub> ist PDF-negativ (Kaneko et al., 1997). Außerdem zeigen alle vier l-LN<sub>v</sub>s eine PDF-immunreaktive Färbung. Sie liegen frontal zwischen der Medulla und dem lateralen Protocerebrum und projizieren sowohl in die ipsilaterale als auch über den posterioren optischen Trakt (POT) in die kontralaterale Medulla, wobei sie nur ipsilateral in die akzessorische Medulla laufen (Helfrich-Förster et al., 2007a).

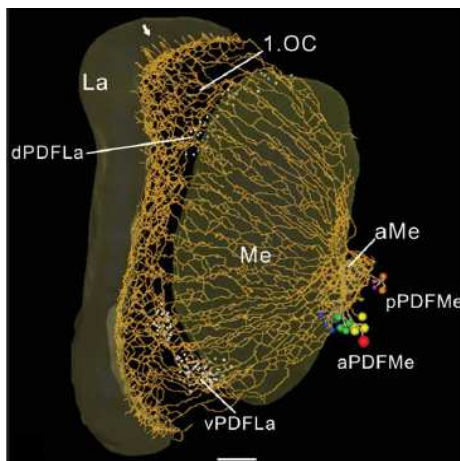


Abb. 1.6: Der optische Lobus mit den PDF-Neuronen von *Leucophaea maderae* (aus Wei et al., 2010). Messbalken 50 µm.

Bei der hemimetabolen Schabe *Leucophaea maderae* gibt es vier Cluster an PDF-Neuronen (Abb. 1.6). Am dorsalen und ventralen Ende, auf der medianen Seite der Lamina (La) befinden sich je 50 bis 70 PDF-Neurone (d- und vPDFLa), die jeweils als Gruppe angeordnet sind und ins erste optische Chiasma (1. OC) projizieren (Wei et al., 2010). Nahe der akzessorischen Medulla (aMe) sind auf deren anterioren Seite zwölf aPDFMe- und auf deren posterioren Seite im Cortex der Medulla acht pPDFMe-Neurone lokalisiert (Reischig and Stengl, 2003b; Wei et al., 2010).

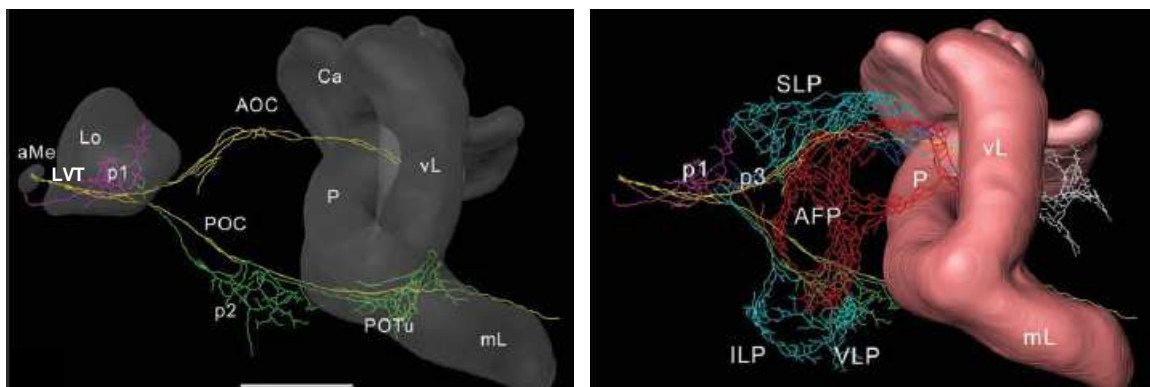


Abb. 1.7: Die PDF-Neuriten im lateralen Protocerebrum der Schabe *Leucophaea maderae*.  
**Links:** Der Lobula-Valley-Trakt (LVT) umläuft die Lobula (Lo) posterior zwischen akzessorischer Medulla (aMe) und Protocerebrum und gabelt sich in die anteriore und posteriore optische Kommissur (AOC, POC).  
**Rechts:** Von den Kommissuren ziehen zahlreiche, sich verzweigende Plexen (p1, 2, ...) weg.  
 Abk.: AFP = anteriorer frontaler Plexus, Ca = Calyces, ILP = inferiores laterales Protocerebrum, mL = medianer Lobus, P = Pedunculus, POTu = posteriores optisches Tuberkel, SLP = superiores laterales Protocerebrum, vL = vertikaler Lobus, VLP = ventrales laterales Protocerebrum.  
 Messbalken 200 µm (aus und nach Wei et al., 2010).

Die aPDFMe lassen sich in jeweils vier große, mittlere und kleine Zellen unterteilen (Reischig and Stengl, 2003b). Erstere verzweigen in die Schale (*shell*) und speziell die anterior liegende Region der akzessorischen Medulla, die als In- und Output-Bereich der

circadianen Uhr bezeichnet werden, da sie Verbindungen mit den optischen Loben und dem mittleren Gehirn haben. Die Zellen mittlerer Größe sind verbunden mit dem inter-nodularen und dem anterioren Neuropil der akzessorischen Medulla. Die kleinen aPDFMe-Neurone liegen lokal innerhalb derselben (Reischig and Stengl, 2003b).

Die Neuriten der aPDFMe verbinden die akzessorische Medulla mit der Medulla und der Lamina über zwei überwiegend getrennte Wege. Einmal erstrecken sie sich über einen anterior verlaufenden „Fächer“ in die am meisten distal liegende Schicht der Medulla, von der sich einige Fasern in die Lamina verlängern, wo sie tangential am inneren Rand verlaufen. Am dorsalen Laminaende ragen mehrere Fasern nach dorsolateral in die äußere „Ecke“ (weißer Pfeil in Abb. 1.6, S. 17). Der andere Weg führt mit deutlich weniger Fasern in eine median liegende Medullaschicht (diese zwei Wege sind in den Abbildungen nicht differenziert sichtbar).

Der Lobula-Valley-Trakt (LVT) liegt zwischen der akzessorischen Medulla und der Gabelung dieses Faserbündels in die anteriore optische Kommissur (AOC) und die posteriore optische Kommissur (POC), umläuft die Lobula posterior und führt ipsi- und kontralaterale Fasern (Abb. 1.7, S. 17). Von der aus zwei dicken Fasern bestehenden POC zweigen im Protocerebrum mehrfach sich verästelnde Geflechte, sogenannte Plexen ab. Gleiches gilt für die AOC, die jedoch aus vier Hauptfasern besteht. Teilweise gehen die Plexen der POC und der AOC zusammen bzw. ineinander über (Wei et al., 2010).

Drei bis fünf schwach gefärbte Fasern konnten Wei et al. (2010) bis zum posterioren Rand des Antennallobus im Deutocerebrum verfolgen. Auch im Tritocerebrum entdeckten sie einige Verzweigungen, aber nie PDF-Somata.

Im Gehirn der holometabolen Honigbiene *Apis mellifera* exprimieren laut Závodská et al. (2003) zehn Zellen pro Hemisphäre das PDH-Ortholog, die in einer Gruppe an der Basis des optischen Lobus lokalisiert sind, wobei ihre Neuriten ins Proto-, Deutocerebrum und ins Suboesophagealganglion führen.

Auch Bloch et al. (2003) fanden die PDF-Neurone in einem Cluster an der entsprechenden Stelle vor. Aufgrund der engen Lage der Zellen zueinander sind sie schwer zählbar. Bloch et al. (2003) schätzten, dass es etwa 20 Neurone pro Hemisphäre seien. Sie konnten keine Größendifferenzierung vornehmen. Innerhalb eines Clusters kommen alle Größen vor, sie variieren von 7 bis 21 µm Weite und 10 bis 29 µm Länge. Die PDF-Cluster können scheinbar willkürlich mit PDF-negativen Zellen vermischt sein.

Die PDF-Neurone beschränken sich laut Bloch et al. (2003) bei der Biene auf den vordersten Gehirnabschnitt, dagegen konnten weitere PDF-Zellen beispielsweise in abdominalen Ganglien von *Drosophila melanogaster* (Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Park

et al., 2000) und von *Locusta migratoria* (Persson et al., 2001) nachgewiesen werden. Im Gehirn der Taufliede wurden je nach Entwicklungsstand noch weitere PDF-Neurone entdeckt, von denen an dieser Stelle nur die im adulten Tier vorzufindenden erwähnt werden. Einige Zellen im Tritocerebrum, die bis zum vierten Tag nach dem Schlüpfen detektierbar sind, projizieren über das „*median bundle*“ in die Pars intercerebralis und P. lateralis (Helfrich-Förster, 1997; Neuropile und Fasertrakte siehe Kapitel 3.3.2, S. 83 und 3.3.4, S. 89). In der gleichen Veröffentlichung wird von zwei bis vier PDF-Zellen nahe der Calyces berichtet, deren Fortsätze sich über das „*median bundle*“ ins Tritocerebrum erstrecken. Diese Färbungen konnten in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Review: Meelkop et al., 2011). Nach Helfrich-Förster et al. (2000) nimmt die Anzahl der PDF-Neurone von der Larve zum adulten Tier ab und die Färbeintensitäten werden bei gleichbleibendem Projektionsmuster im Laufe des Alters immer geringer. Bei der Biene sind die larvalen PDF-Verhältnisse bis dato nicht publiziert. Kay and Helfrich-Förster untersuchten Larven auf das Vorkommen von PDF und konnten eine Färbung feststellen (unveröffentlicht, persönliche Mitteilung).

Verallgemeinernd formuliert (nach Závodská et al., 2003) projizieren in Insektengehirnen die PDF-Neuriten über die frontale Oberfläche der Medulla halb-trichterförmig, bei einigen Spezies setzen sie sich über die laterale Medullaseite hinaus fort und enden in der Lamina. Vom Zellcluster aus ziehen ein bis zwei Bündel ins Protocerebrum, wo sich Kollaterale gabeln und schließlich zu weitläufigen Verzweigungen aufteilen. Ein bis zwei Äste verlängern sich median, um beide optische Loben zu verbinden.

Detaillierter skizzieren Bloch et al. (2003) die PDF-Projektionsmuster bei der Honigbiene. In der Lamina ziehen vereinzelt dünne Fortsätze tangential durch die ganze Struktur. In gleicher Art projizieren etwas mehr Neuriten parallel in der Bienen-„*serpentine layer*“ der Medulla (Abb. 4.19, S. 166). Die Wissenschaftler vermuten, dass diese identisch sind mit den in Ribi and Scheel (1981) erwähnten tangentialen Faserelementen, deren Zellkörper in Clustern in der anterioren perikaryalen Schicht um die Oberseite der Medulla liegen. Der Eintritt der Fasern in die „*serpentine layer*“ erfolgt scheinbar über das bei *D. melanogaster* beschriebene, dorsal in die Medulla hineinziehende „*Cuccati's bundle*“ (Fischbach and Dittrich, 1989), das Fortsätze aus der Medulla und der Lamina – auch von kontralateral – führt. In der Lobula registrierten Bloch et al. (2003) „eine geringe Anzahl an Fasern, die im mittleren Teil der Lobula verzweigen“.

Im Protocerebrum erkannten sie zahlreiche Fasern, die von den PDF-Somata aus ins dorsoantere und -posteriore Protocerebrum ziehen. Sie beschreiben ein dickes Band aus um sich selbst wickelnden Neuriten, die zwischen den Calyces und dem vertikalen Lobus der Pilzkörper dem Rand des Protocerebrums folgend zum Kragen (*collar*) und

Basalring (*basal ring*) der Pilzkörper ziehen und vergleichen dieses Band mit dem in z. B. Mobbs (1982) deklarierten „*anterior superior optic tract*“. Zudem sahen sie außen um den dorsalen und lateralen Rand des vertikalen Lobus Fasern verlaufen. Am äußeren Rand des lateralen Protocerebrums fiel ihnen ein kompaktes Bündel aus varikosen Fortsätzen auf, das nach dorsal zieht. Sie stellten fest, dass viele Fasern zwar im ventrolateralen ersten Gehirnabschnitt verzweigen, aber in das optische Tuberkel zumindest im anterioren Bereich nie eintreten. Weitere PDF-immunreaktive Fortsätze verlaufen um den Zentralkörper, um die Noduli des Zentralkomplexes, in der Pars intercerebralis und in den ocellaren Trakten. Sie beschreiben zudem Neuriten, die in die lateralen protocerebralen Loben führen, wo Projektionsneurone der Antennalloben enden.

An PDF-Kommissuren erwähnen sie die posteriore und anteriore optische Kommissur sowie querende Fortsätze an der, wie sie schreiben, „Basis“ des Protocerebrums, womit vermutlich die ventrale Einkerbung (*ventral crotch*) gemeint ist (vgl. Abb. 3.11, S. 84: Erklärung „Graublau“). Der Ursprung der optisch kommissuralen Fasern scheint „mit dem Lobula-Valley-Trakt, beschrieben bei der Schabe (Reischig and Stengl, 2002; Wei et al., 2010), zu korrespondieren“ (Bloch et al., 2003).

Um ein detailliertes Bild über den dreidimensionalen Verlauf der PDF-Neuriten im Gehirn der Honigbiene zu erhalten wie in dem der Schabe (Wei et al., 2010) und die erste Beschreibung von Bloch et al. (2003) räumlich zu verifizieren, soll in dieser Dissertation das neuronale PDF-Netzwerk im Gehirn einer exemplarischen Biene mithilfe der Computersoftware Amira® erstellt werden.

### 1.5.3 Hinweise zu den Funktionen von PDF in Insektengehirnen

Aus der Erkenntnis der Existenz einer endogenen Uhr, bestehend aus Schrittmacherneuronen mit intrazellulären, molekularen Mechanismen, resultieren Fragen nach einer interneuronalen Kommunikation und der Übertragung von Oszillationen auf rhythmische Verhalten. Zahlreiche Versuche weisen darauf hin, dass PDF eine oder auch mehrere Rollen im circadianen Zeitsystem innehat.

Frühe Hinweise dafür, dass PDF etwas mit der Inneren Uhr zu tun haben könnte, brachten die PDF-Projektionsmuster bei Wildtypen und verschiedenen Mutanten von *Drosophila melanogaster*, die durch Mutationen in den Uhrgenen verändert aussahen (Helfrich-Förster and Homberg, 1993).

Es zeigte sich, dass bei der Taufliede nur die LN<sub>s</sub> (Kapitel 1.3), die als wichtige Schrittmacher gelten, auch PDF exprimieren (Kaneko et al., 1997; Helfrich-Förster and Hom-

berg, 1993; Helfrich-Förster, 1995; Helfrich-Förster et al., 1998; 2007a), weswegen sie als PDF-Neurone deklariert wurden (Helfrich-Förster and Homberg, 1993).

Mittlerweile gilt als bewiesen, dass PDF für einen normalen Lokomotor-Aktivitätsrhythmus bei *D. melanogaster* unerlässlich ist. Der Wildtyp zeigt zwei Aktivitätsphasen, einen Morgen- und einen Abend-Peak (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). PDF- oder PDF-Rezeptor-Nullmutanten verändern ihr rhythmisches Verhalten. Sie verlieren ihre Morgenaktivität, ihr Abendmaximum erscheint etwa zwei Stunden „advanced“ und unter DD werden sie letztendlich arrhythmisch (Renn et al., 1999; Hyun et al., 2005).

PDF scheint als Kopplungs- und/oder Outputfaktor in Frage zu kommen, da Mutanten ohne PDF im Freilauf eine signifikant kürzere Periodenlänge in ihrer lokomotorischen Aktivität ausprägen, dagegen mit konstant zu viel im dorsalen Protocerebrum eine signifikant längere (Helfrich-Förster et al., 2000). Egal ob kein oder zu viel PDF, unter DD werden sie letztendlich komplex rhythmisch oder arrhythmisch. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass wenn der PDF-Level gestört ist, die Fliege ihren endogenen Rhythmus nicht aufrecht erhalten kann. Daher wird vermutet, dass PDF mit der Stabilität des circadianen Systems zu tun hat und die Schrittmacherzellen untereinander koppelt.

Park et al. (2000) stellten fest, dass weder die Transkription in *Pdf*-mRNA noch die Translation zum Peptid rhythmisch sind, sich in den Axonterminalen jedoch eine täglich oszillierende PDF-Immunreaktivität zeigte. Die höchsten Level existieren am frühen Morgen, die niedrigsten eine Stunde nach Licht-aus. Die Freisetzung von PDF scheint also rhythmisch zu erfolgen.

Auch bei anderen Insekten verdichteten sich die Hinweise, dass PDF verschiedene Funktionen in dem circadianen Zeitsystem hat. Das Erscheinen von PDF-Varikositäten im Gehirn der Stubenfliege *Musca domestica* oszilliert über den Tag hinweg, was zudem auf eine parakrine Freisetzung hindeutet (Pyza and Meinertzhagen, 1997a). Auch die Akkumulation und Freisetzung von PDF, gepackt in „dense core vesicles“, in der distalen Medulla der Stubenfliege ist rhythmisch (Miśkiewicz et al., 2004; 2008). PDF beeinflusst die Anzahl der Synapsen zwischen den Photorezeptor-Terminalen und den Interneuronen L1 und L2. Zudem ist die Axongröße und -form dieser Interneurone tagsüber größer als nachts (Meinertzhagen and Pyza, 1996; 1999).

Bei der Schabe *Leucophaea maderae* agieren die PDF-immunreaktiven Neurone definitiv als circadiane Schrittmacher, die das rhythmische lokomotorische Verhalten kontrollieren. Injizierten Petri and Stengl (1997) PDH in die Nähe der akzessorischen Medulla, verursachte das Phasenverschiebungen in der circadianen Lokomotoraktivität. Dabei ist der Zeitpunkt der Behandlung entscheidend. Injektionen spät am subjektiven Tag bewirkten

einen maximalen „*phase delay*“ von bis zu 4,7 Stunden, wobei eine niedrigere Konzentration auch zu einem verminderten „*delay*“ führte. Erfolgte das Einspritzen spät in der subjektiven Nacht, resultierte ein „*phase advance*“ von maximal 1,8 Stunden. Auf die Periodendauer wirkte sich PDH nicht aus. Daraus schlossen die Forscher, dass PDH hauptsächlich in Phasen mit geringem Lichteinfluss wirkt. Diese Reaktionen würden zeigen, dass PDH bei der Schabe in den Licht-Input integriert ist oder es einem nicht-photischen Input-Signal entspricht, das mit den circadianen Schrittmacherneuronen synchronisiert.

PDF ist im Gehirn von *L. maderae* eng assoziiert mit der akzessorischen Medulla. Transplantationsversuche bei Schaben ohne optische Loben zeigten, dass eine Regeneration der circadianen Lokomotoraktivität mit der Regeneration von PDF-Fasern im Gehirn korreliert ist (Reischig and Stengl, 2003a).

Bei der Honigbiene scheint, wie bereits im Kapitel 1.1 erläutert, die Entwicklung des Verhaltensrhythmus von der jüngeren, arrhythmischen Stockbiene zur älteren, tagesrhythmischen Sammelbiene primär endogen gesteuert zu werden, wobei soziale Faktoren – vermutlich der Kontakt zur Brut – diese modifizieren können (Bloch and Robinson, 2001; Bloch et al., 2003; Shemesh et al., 2007). Bei der Hummel *Bombus terrestris* korreliert die Größe der Tiere mit der Arbeitsteilung. Große Hummeln mit einem Gewicht von bis zu 506 mg sammeln Pollen und Nektar und zeigen einen strengen diurnalen Rhythmus, wohingegen kleine Hummeln mit teilweise nur 56 mg Körpergewicht im Nest bleiben und dort arrhythmisch Nestaufgaben erledigen (Mares et al., 2005; Yerushalmi et al., 2006). Interessanterweise exprimieren in den Gehirnen großer Hummeln signifikant mehr Neurone PDF als in kleinen (Weiss et al., 2009).

Ob PDF auch bei der Honigbiene *Apis mellifera* prinzipiell eine Rolle bei der Ausprägung des circadianen Verhaltens respektive der Arbeitsteilung spielt, soll in diesem Projekt getestet werden.

Es ist nicht bekannt, ob PDF im Bienenhirn zeitlich oszilliert. Bloch et al. (2003) fanden keine altersbedingten und zeitlichen Unterschiede in der Anzahl der PDF-Neurone und deren Somagröße, jedoch eine nicht signifikante Tendenz für etwas stärker gefärbte Fasern in den Gehirnen älterer Bienen. Im Gegensatz zu *Drosophila* scheinen sämtliche PER- und PDF-immunreaktiven Neurone nicht kolokalisiert zu sein. Diese Dissertation soll klären, ob PDF im Zytoplasma der PDF-Neurone rhythmisch exprimiert wird oder es in den Fasern bzw. Varikositäten zeitlich unterschiedliche Konzentrationen gibt. Außerdem soll untersucht werden, ob eine mögliche PDF-Oszillation mit dem rhythmischen Verhalten korreliert sein könnte (vgl. Kapitel 1.6).

## 1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation kann in drei Bereiche gegliedert werden.

Im ersten Komplex sollten mögliche Oszillationen des in Insektengehirnen vorkommenden „*Pigment-Dispersing Factor*“ (PDF) in Neuronen des Gehirns der Honigbiene *Apis mellifera* in Abhängigkeit der Zeit untersucht werden. Der Schwerpunkt war vorerst auf eventuelle Unterschiede zwischen arrhythmischen Stockbienen und diurnal rhythmischen Sammelbienen gerichtet. Daran anschließende Experimente dienten dazu zu klären, ob die entdeckten signifikanten Oszillationen endogen gesteuert oder von dem exogenen Zeitgeber Licht beeinflusst werden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Antiserum gegen PDH (Dircksen et al., 1987).

Der zweite Teil zielte auf die Identifizierung und Lokalisation etwaiger TIM-, PER- und CRY-Uhrneurone im Gehirn von *Apis mellifera*, die mit speziell in dem Labor von Guy Bloch, Hebron Universität in Jerusalem, entwickelten Antikörpern immunhistochemisch detektiert werden sollten.

Der dritte Bereich hatte zum Ziel, am Beispiel eines Bienengehirns das PDF-Netzwerk mithilfe der Computersoftware Amira<sup>®</sup> dreidimensional darzustellen. Dazu musste die Ganzhirnfärbung optimiert werden. Die Realisierung erfolgte mit zwei Ansätzen: zum einen wurden die Neuropile eines exemplarischen Bienengehirns visualisiert, zum anderen das PDF-Netzwerk mit dem „Neuron Tracer Plug-in“ rekonstruiert. Beide Expertisen wurden anschließend übereinandergelegt. Die 3-D-Rekonstruktion veranschaulicht die Projektionen der PDF-Neurone und die detaillierten Verläufe der PDF-Neuriten innerhalb des Gehirns.



## 2 Material und Methoden

Das Projekt, eine zeitliche PDF-Oszillation im Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera* zu erforschen, wurde ursprünglich von der German Israeli Foundation (März 2006 bis Dezember 2008, Mai bis Juni 2009) gefördert. Die Zusammenarbeit erfolgte mit Prof. Dr. Guy Bloch von der Hebron Universität in Jerusalem. In Blochs Labor war die Bienenzucht zu kontrollierten verschiedenen Bedingungen etabliert, in Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Försters Labor in Regensburg dagegen die Fluoreszenz-Immunhistochemie. Beide Expertisen sollten kombiniert werden. So stammten die zu untersuchenden Bienen zunächst (für die ersten beiden Experimente, Übersicht in Kapitel und Tab. 2.1) aus Jerusalem, wurden dort unter den gewünschten Bedingungen gehalten, zu verschiedenen Zeitpunkten getötet, das Gehirn präpariert, fixiert und anschließend nach Regensburg geschickt. Im Gegensatz zur Bundesrepublik Deutschland stehen in Israel Bienen ganzjährig, unabhängig von den Jahreszeiten zur Verfügung.

Das Färben, Scannen am konfokalen (engl. *confocal*) Laserscanning Mikroskop (CLSM) sowie die Quantifizierung der Färbeintensitäten wurden an der Universität Regensburg durchgeführt.

Einige Schwierigkeiten bei der Bewertung des zweiten Versuchs (vgl. Kapitel 2.1.1) führten jedoch dazu, dass die Honigbienen (*Apis mellifera*) für die weiteren Experimente aus Bienenstöcken der Universität Regensburg genommen wurden. Die Bedingungen für die Synchronisation der Tiere im Inkubator wurden uns von einem Mitarbeiter der Hebron Universität vermittelt, damit die verschiedenen Experimente miteinander verglichen werden konnten.

Unabhängig von der Hebron Universität in Jerusalem erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion des PDF-Netzwerks im Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera* mithilfe der Computersoftware Amira®.

## 2.1 Die Experimente

Bei allen untersuchten Bienen, sowohl denen aus Israel als auch aus Regensburg, handelt es sich um die Europäische Honigbiene *Apis mellifera* L. Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Versuche durchgeführt:

Tab. 2.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente

<b>Experiment</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Zeitgeber Time (ZT)</b>	<b>Herkunft (Bienen)</b>
<b>Vorversuche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wurden im Vorfeld gemacht</li> </ul>	verschiedene	Israel
<b>Exp. 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleich der PDF-Neurone</li> <li>• Stockbienen – Sammlerinnen</li> <li>• Zyklus LD 12:12</li> </ul>	4, 10, 16, 22	Israel (Bienenstock)
<b>Exp. 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleich der PDF-Neurone</li> <li>• Stockbienen – Sammlerinnen</li> <li>• Zyklus LD 12:12</li> </ul>	2, 6, 10, 14, 18, 22	Israel (Bienenstock)
<b>Exp. 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleich der PDF-Neurone</li> <li>• Sammlerinnen</li> <li>• Zyklus LD 12:12</li> </ul>	2, 6, 10, 14, 18, 22	Uni Rgbg. (Inkubator)
<b>Exp. 4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleich der PDF-Neurone</li> <li>• Sammlerinnen</li> <li>• Zyklus DD</li> </ul>	2, 6, 10, 14, 18, 22	Uni Rgbg. (Inkubator)
<b>Exp. 5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lokalisation möglicher TIM-, PER- und CRY-Neurone</li> <li>• Sammlerinnen</li> </ul>	siehe Tab. 2.2, S. 28	Uni Rgbg.
<b>Ganzhirn-Färbungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-D-Visualisierung des PDF-Netzwerks im Bienen-Ganzhirn</li> <li>• Sammlerinnen</li> </ul>	verschiedene	Uni Rgbg.

Abk.: CRY = CRYPTOCHROM; DD = Dauerdunkel; Exp. = Experiment; LD = Licht-Dunkel-Wechsel; PDF = Pigment-Dispersing Factor; PER = PERIOD; Rgbg. = Regensburg; TIM = TIMELESS; ZT = Zeitgeber Time; ZT0 = Licht-an; ZT12 = Licht-aus.

### 2.1.1 Oszillationen in den PDF-Neuronen

In **Vorversuchen** musste das Färbeprotokoll vom in Jerusalem etablierten enzymatischen Nachweis der Antigene (Meerrettichperoxidase/DAB) auf Immunfluoreszenz umgestellt werden, da nur letztere eine Quantifizierung erlaubt. Der in den Färbungen verwendete Antikörper stammte von Heinrich Dirksen (Stockholm, 1987) und ist gegen das „*Pigment-Dispersing Hormone*“ (PDH) aus Krabben gerichtet. Mit diesem Antikörper wurde zuvor schon an *Drosophila melanogaster* gearbeitet. Die Färbungen erfolgten im Gegensatz zur Tauffliege an Vibratomschnitten (vgl. 2.4.3) von in Gelatine-Albumin eingebetteten Bienen-gehirnen (2.4.2), da sie wesentlich größer sind. In den Vorversuchen wurden die Schnittdicke und die Antikörperkonzentration optimiert. Es ergab sich eine Schnittdicke von 60 µm und eine Konzentration von 1:1500 für den primären Antikörper. Alle Vorversuche

waren vor Beginn der Dissertation bereits von der Technischen Assistenz durchgeführt worden.

Im **ersten Experiment** wurden an der Universität Hebron in Jerusalem sowohl Stock- als auch Sammelbienen zu vier verschiedenen Zeitpunkten gesammelt (engl. „Zeitgeber time“ ZT4, 10, 16, 22; wobei ZT0 Licht-an und ZT12 Licht-aus bedeutet), die Gehirne aus der Kopfkapsel herauspräpariert und fixiert. Diese wurden anschließend der Universität Regensburg geschickt und hier mit einem Vibratom in Schichten geschnitten, eingebettet, gefärbt und ausgewertet (siehe unten). Die Färbung erledigte damals die Technische Assistenz, die Auswertung ich. Zu beachten ist, dass alle Bienen direkt aus dem Bienenstock stammten und in diesem Fall im Monat Oktober beprobt wurden. Die Zeiten für Sonnenauf- und -untergang waren 5:42 und 17:07 Uhr, die Beprobungszeiten für ZT4, 10, 16 und 22 umgerechnet 9:40, 15:40, 21:40 und 3:40 Uhr.

Es stellte sich heraus, dass die vier Zeitpunkte für eine Bewertung nicht aussagekräftig genug waren (Ergebnisse 3.1.1.1, Diskussion 4.1.1). Daher wurden für das **zweite Experiment** sechs Zeitpunkte gewählt (ZT2, 6, 10, 14, 18 und 22 umgerechnet aus den Uhrzeiten 7:45, 11:45, 15:45, 19:45, 23:45 und 3:45 Uhr bei Sonnenaufgang um 5:33 Uhr und -untergang um 17:56 Uhr im Monat März), mit denen das erste Experiment wiederholt wurde. Auch diese Stock- und Sammelbienen stammten aus Israel.

Bei der Auswertung ergab sich, dass einige Proben ungewöhnliche Anomalien zeigten: Das Gewebe mehrerer Bienengehirne war bräunlich verfärbt, wies viele markante Löcher auf (Abb. 4.7, S. 140) und zeigte teilweise eine schwache bis gar keine Immunfärbung. Normalerweise hatte das Gewebe keine Löcher und eine deutlich grüne Grundfarbe. Vorhandene PDF-Neurone waren in der Regel leuchtend gefärbt, auch bei schwächerer Färbung. Das führte zu unvollständigen und fragwürdigen Resultaten. Der Grund für die Auffälligkeiten lag vermutlich im Transport. Trotz einiger Telefonate hielt das Veterinäramt in Frankfurt die Sendung mit den Honigbienengehirnen aus Israel zurück und gab sie erst nach drei Tagen frei. Das führte wahrscheinlich zu Problemen in der Gewebeerhaltung, z. B. durch zu hohe Lagertemperaturen. Dieser Umstand beeinflusste insbesondere zwei Zeitpunkte negativ (Ergebnisse 3.1.1.2, Diskussion 4.1.2).

So wurde entschieden, einen weiteren Versuch mit *Apis mellifera* aus Regensburg durchzuführen (**drittes Experiment**), um eine unfachgemäße Aufbewahrung zu vermeiden. Die Tiere stammten nun vom universitätseigenen Bienenstock. Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass zwischen Stock- und Sammelbienen kein deutlicher Unterschied in der Oszillation zu erwarten ist. Daher beschränkte sich der Versuch auf Sammlerinnen. Die Tiere wurden für drei bis vier Tage im Inkubator unter definierten, mit denen in Israel vergleichbaren Bedingungen gehalten (vgl. 2.3). Die Haltung von Bienen im Inkubator so-

wie die Präparation der Gehirne wurden uns von einem Mitarbeiter der Universität in Jerusalem vermittelt. Analog zum vorherigen Versuch erfolgte die Probenahme zu den bekannten sechs Zeitpunkten. Die Auswertung des dritten Experiments bestätigte, dass es sich bei den zwei kritischen Zeitpunkten aus der zweiten Untersuchung tatsächlich um ein Artefakt bzw. einen Fehler handeln musste, der auf mangelnde Fixierung, Austrocknung oder Überhitzung während des Transports zurückzuführen war. Ließ man diese beiden Messpunkte weg, waren die Kurven der Färbeintensitäten von den Bienen aus Jerusalem und denen aus Regensburg sehr ähnlich (Ergebnisse 3.1.2.1, Diskussion 4.1.3).

Zudem zeigten die Ergebnisse, dass in zwei Gehirnregionen eine signifikante Oszillation existiert. Daher folgte ein **viertes Experiment** im Dauerdunkel (DD) mit Sammlerinnen aus den Bienenstöcken der Universität Regensburg, um zu klären, ob die Innere Uhr auch ohne den Zeitgeber Licht endogen weiterläuft oder exogen gesteuert wird. Identisch zu den vorherigen beiden Untersuchungen wurden die gleichen sechs Zeitpunkte (ZT2, 6, 10, 14, 18, 22) beprobt. Die Hymenopteren wurden zu den bekannten Bedingungen im Inkubator, dieses Mal jedoch im DD, gehalten (Ergebnisse 3.1.2.2, Diskussion 4.1.4). Leider überlebte der im dritten Experiment untersuchte Bienenstock nicht den Winter 2008/2009. Daher handelt es sich bei dem DD-Versuch im vierten Experiment um ein anderes, benachbartes Bienenvolk. Innerhalb der einzelnen Versuche stammen die Arbeiterinnen aber ausschließlich von ein und demselben Stock.

## 2.1.2 Lokalisation von CRY-, PER- und TIM-Neuronen

Alle vorangegangenen Versuche dienten der Lokalisation der PDF-Neurone und der Quantifizierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Das **fünfte Experiment** sollte in den Gehirnen von Sammlerinnen weitere Neurone lokalisieren, die die Proteine TIMELESS (TIM), PERIOD (PER) und/oder den Blaulichtrezeptor CRYPTOCHROM (CRY) exprimieren. Bei *Drosophila melanogaster* findet sich die größte Konzentration von TIM und PER kurz vor Licht-an (Rieger, 2007). So wurde auch *Apis mellifera* etwa eine Stunde vor Sonnenaufgang (Sa) beprobt, zudem etwa eine Stunde vor Sonnenuntergang (Su). Bei den Bienen handelte es sich um durch den natürlichen Tag-Nacht-Wechsel synchronisierte Tiere, die direkt am Stockeingang gefangen wurden. Die Bienen für „eine Stunde vor Licht-an“ wurden am Abend gefangen, um 18 Uhr (entsprach etwa Su) in den Inkubator mit den üblichen Bedingungen überführt und am nächsten Morgen eine Stunde vor Licht-an (Sa) getötet und präpariert (2.4). Zeitlich abgedeckt wurden außerdem die nächtlichen Zeitpunkte ZT14, 16 und 18, zu denen Rubin et al. (2006) und Bloch et al. (2010) höhere Uhr relevante mRNA-Konzentrationen beschrieben hatten (Abb. 1.3, S. 13), sowie

Zeitpunkte während des Tages. Bei diesen Gehirnen handelt es sich unter anderem um restliche Proben aus früheren Versuchen, bei denen die Bienen im Labor durch künstlichen LD-Wechsel synchronisiert worden waren. Die Details sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Schnittdicke betrug bei diesem Versuch 80 µm.

Tab. 2.2: Versuche und abgedeckte Zeitpunkte im fünften Experiment

<b>Färbung</b>	<b>AK 1</b>	<b>MEZ oder ZT</b>	<b>Sa, Su / LD</b>	<b>Fixierung</b>
<b>Einfachfärbung</b>	anti-TIM	5:30 Uhr, 6:30 Uhr, 16:00 Uhr, 17:00 Uhr	Sa: 6:38 Uhr Su: 17:59 Uhr	4 % PFA
<b>Doppelfärbung</b>	anti-CRY anti-PER	5:30 Uhr, 6:30 Uhr, 16:00 Uhr, 17:00 Uhr	Sa: 6:38 Uhr Su: 17:59 Uhr	4 % PFA
<b>Dreifachfärbung</b>	anti-CRY anti-PER anti-TIM	ZT 10, 22	LD 12:12	Zamboni's Fixativ
<b>Dreifachfärbung</b>	anti-CRY anti-PER anti-PDH	ZT 2, 14, 18	LD 12:12	Zamboni's Fixativ
<b>Einfachfärbung</b>	anti-PER	10:30 Uhr, 15:00 Uhr	Sa: 7:23 Uhr Su: 17:12 Uhr	Zamboni's Fixativ
<b>Einfachfärbung parallel mit Doppelfärbung</b>	anti-PER anti-PER anti-PDH	je 5:30, 8:30, 10:30, 15:30 Uhr; Doppelf. noch 7:00, 11:00 Uhr	Sa: 7:23 Uhr Su: 17:12 Uhr	Zamboni's Fixativ

Abk.: AK 1 = Primärer Antikörper; CRY = CRYPTOCHROM; LD = Licht-Dunkel-Wechsel; MEZ = Mittel-europäische Zeit; PDH = Pigment-Dispersing Hormone; PER = PERIOD; PFA = Paraformaldehyd; Sa = Sonnenaufgang; Su = Sonnenuntergang; TIM = TIMELESS; ZT = Zeitgeber Time, ZT0 = Licht-an, ZT12 = Licht-aus.

Bei der Dreifachfärbung mit anti-CRY, anti-PER und anti-PDH zeigten wie erwartet die PDF-Zellen eine Färbung (3.2, S. 81). Einige dieser Zellen waren jedoch auch mit anti-PER gefärbt. Nun musste geklärt werden, ob es sich tatsächlich um anti-PER-Neurone handelt oder z. B. um eine Kreuzreaktion der Antikörper. Da es keine Nullmutanten bei den Honigbienen gibt, wurde eine Einfachfärbung mit anti-PER parallel zu einer Doppelfärbung mit anti-PER und anti-PDH an Bienen Gehirnen gleicher Uhrzeiten durchgeführt.

### 2.1.3 Dreidimensionale Darstellung des PDF-Netzwerks in einem exemplarischen Gehirn von *Apis mellifera*

Das **sechste Experiment** zielte auf die dreidimensionale Darstellung des PDF-Netzwerks im Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera*. Die Tiere stammen aus den Bienenstöcken der Universität Regensburg. Es handelt sich ausschließlich um Sammelbienen, die zu unterschiedlichen Tageszeiten gefangen wurden. Direkt im Anschluss an das Fangen fand die Präparation, Fixierung und Färbung statt. Für die Rekonstruktion war es wichtig, dass das PDF-Netzwerk in ungeschnittenen Ganzhirnen gefärbt werden konnte, damit einerseits keine Bereiche aufgrund des Schneidens fehlten, zum anderen es nicht zu Verzerrungen

und damit zum erschwerten Zusammensetzen der Teilausschnitte kam. Damit ein Scannen überhaupt möglich war, musste das etwa einen halben Millimeter dicke Gewebe entwässert und aufgeklärt werden. Trotzdem kam der Laser des konfokalen Mikroskops nur bis zur Hälfte des Bienengehirns durch. Daher wurde das Gehirn von zwei Seiten jeweils bis zur Mitte gescannt, dann mit der Computersoftware Amira® visualisiert und zusammengesetzt.

## 2.2 Probenahme von Honigbienen für die Versuche



Abb. 2.1: Der „Bienensauger“ saugt die Biene durch das Saugrohr in den Sammelbecher, wo ein Schaumstoffstopfen das Einsaugen in das Gerät verhindert. Ein Stopfen am Saugrohrende versperrt den Fluchtweg (Arbeitsgruppe Strohm, Universität Regensburg).

Um sicher zu gehen, Sammlerinnen einzufangen, wurden nur Pollensammlerinnen mit beladenen Pollenhöschen bei der Heimkehr von ihren Sammelflügen direkt am Stockeingang abgepasst. Mithilfe eines umgebauten Akku-Handstaubsaugers (Abb. 2.1) konnten die Heimkehrer gezielt eingesogen werden.

Innerhalb eines Experiments stammen alle Tiere von demselben Bienenstock. So wird eine „bedingte genetische Stabilität“ erreicht. Allerdings existieren in einem Bienenvolk unterschiedliche Genotypen, da sich die Königin mit mehreren Drohnen paart und somit die Eier mit Samen unterschiedlicher Herkunft befruchtet. Leider ging der Bienenstock vom dritten Experiment im Winter zugrunde. So war es notwendig, für das vierte Experiment auf einen anderen Stock auszuweichen.

## 2.3 Entrainment zur Synchronisation der Honigbienen

Die gefangenen Bienen kamen sofort in durchsichtige Kunststoffkäfige (Abb. 2.2). Dazu wurden sie kurz mit Kohlendioxid betäubt. In einer senkrecht aufgestellten, transparenten Mikrotiterplatte stand ihnen Wasser zum Trinken sowie Zuckerwasser als Futter zur Verfügung.

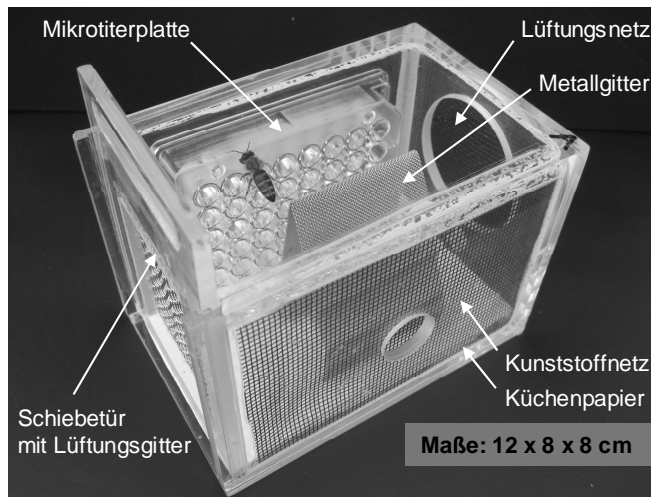


Abb. 2.2: Käfig für das Entrainen der Honigbienen.

Mit einer langen Injektionsnadel konnte man bei Bedarf Wasser und Futter in die Vertiefungen der Platte nachfüllen, ohne den Käfig zu öffnen, was die Bienen offensichtlich beunruhigte und möglichst vermieden wurde. Senkrecht befestigte, lichtdurchlässige Kunststoffnetze dienten den Insekten zum Festhalten, Krabbeln und als Schlafplatz. Eine Lage herausziehbares Küchenpapier auf dem Käfigboden ermöglichte, den

geschlossenen Käfig von heruntergefallenen Pollen und Exkrementen zu befreien. Tote Tiere wurden unverzüglich entfernt.

Um die Versuchstiere an einen bestimmten Licht-Dunkel-Zyklus zu synchronisieren, wurden sie in einem Inkubator unter konstanten Bedingungen gehalten. Für die Versuche kamen zwei Käfige gleichzeitig zum Einsatz, von denen jeder zwischen 30 und 40 Individuen enthielt. Die Temperatur im Inkubator betrug 28°C. Für die Luftbefeuchtung sorgte ein 10x10 cm großes, mit Wasser gefülltes Schälchen; die relative Luftfeuchtigkeit erreichte 80 %. Als Lichtquelle diente eine 150 W Halogenlampe. Messungen mit dem Potentiometer ergaben in der Mitte des Inkubators 740 bis 750 Lux. Ein Timer regelte automatisch den Licht-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden Licht zu 12 Stunden Dunkel (LD 12:12). Für die Luftzirkulation sorgte ein 10x10 cm großer 12 V-Ventilator, ohne den die Tiere innerhalb von ein bis zwei Tagen starben.

Die Honigbienen für den LD-Versuch (**drittes Experiment**) wurden am Spätnachmittag gesammelt und um 18:00 Uhr (MEZ), zu einem Zeitpunkt, zu dem die Bienen auch draußen am Bienenstock nicht mehr ausflogen, in den dunklen Inkubator gegeben. (Gab man sie in den hellen Inkubator, schienen sie sehr gestresst und starben noch in den nächsten Stunden.) Dann wurden sie dreieinhalb Tage dem oben beschriebenen LD 12:12 aus-

gesetzt. Am Morgen des vierten Tages begann die Probenahme zusammen mit der Präparation der Gehirne.

Für den DD-Versuch (**viertes Experiment**) wurden die gefangenen Bienen ebenfalls um 18:00 Uhr in den dunklen Inkubator überführt. Die Tiere wurden dreieinhalb Tage im Dunkeln gehalten, ihre Versorgung fand unter Rotlicht statt. Auf ein vorhergehendes Entrainment an LD 12:12 wurde aufgrund der hohen Sterberate bei Licht verzichtet. Die Honigbienen starben hauptsächlich während der Licht-, kaum während der Dunkel-Phasen. Vermutlich stehen vor allem Sammelbienen, die bei Licht ausfliegen und sammeln wollen, in dem Käfig, der das Verhalten verhindert, unter Stress. Zudem handelt es sich bei Sammlerinnen zwangsläufig um ältere Tiere (1.1). Aufgrund ihrer Lebenserwartung zeigen diese Individuen ebenfalls eine erhöhte Sterberate. Auch Moore and Rankin (1985) berichteten bei ihren Versuchen zur Rhythmik von nur 38 % der Versuchstiere, die sieben Tage in Käfigen überlebten.

## 2.4 Aufbereitung der Proben

### 2.4.1 Probenahme nach dem Entrainment und Präparation der Bienengehirne

Nach dem Entrainment begann die Probenahme der nun synchronisierten Tiere. Alle vier Stunden wurden acht bis zehn Bienen mit einer Pinzette an den Flügeln gefangen und den Käfigen entnommen. Die mit einer Schere vom Bienenkörper abgetrennten Köpfe wurden sofort in einem mit Paraffin gefüllten Glas-Petrischälchen befestigt.

Dazu schmilzt man mit einer heißen Lötkolbenspitze ein etwa bienenkopfgroßes Loch ins Paraffin und legt den Bienenkopf mit den Antennen nach oben hinein, so dass er mit der vorderen Seite aus dem flüssigen Paraffin herausragt. Für die Präparation füllt man das Schälchen mit 0,1 M Phosphatpuffer (PB) auf. Unter dem Binokular werden zuerst die Fühler an ihrer Basis entfernt. Anschließend schneidet man mit der Rasierklinge (Klingendreher) die Cuticula leicht ein, wie in der schematischen Zeichnung an der perforierten Linie dargestellt (Abb. 2.3, S. 32). Zu tiefes Schneiden könnte das Gehirn verletzen. Danach wird der „Deckel“ abgehoben. Nach dem Entfernen der Hypopharynx- und Mandibeldrüsen sowie möglichst vieler Tracheen folgt das Herausnehmen des Gehirns. Mit einer feinen Pinzette lockert man vorerst beide optische Loben, führt die Pinzette dann von einer Lobus-Seite beginnend unter das Gehirn und hebt es nach oben heraus. Durch vorsichtigen Zug werden die beiden Antennennerven und Schlundkonnektive durchgerissen. Die Präparation sollte zügig ablaufen und das Gehirn so schnell wie möglich



fixiert werden. Für den DD- und den LD-Versuch während der Dunkel-Phase müssen alle Schritte bis einschließlich zur Vorfixierung unter Rotlicht stattfinden.

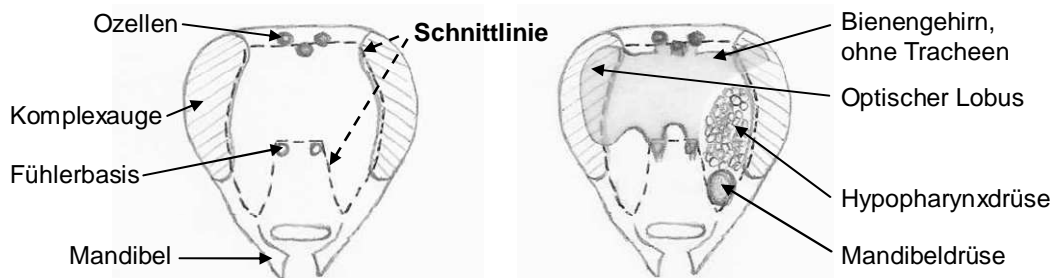


Abb. 2.3: Präparation des Honigbienengehirns (schematisch).

**Links:** Einschneiden der Cuticula. **Rechts:** Entfernen der Tracheen und Drüsen.

Damit die nachzuweisenden Proteine, die Struktur und die Gestalt der Zellen erhalten bleiben, müssen sie mit quervernetzenden Chemikalien, z. B. Formaldehyd, behandelt werden. Die herauspräparierten Gehirne sind daher sofort in Zamboni's Fixativ (siehe Kapitel 2.8, S. 63) bei 4°C vorzufixieren. Erfahrungsgemäß führt bei der PDF-Färbung die Behandlung mit Zamboni's Fixativ zu besseren Ergebnissen als mit Paraformaldehyd (4 % PFA; siehe ebenfalls 2.8). Für die CRY-, PER- und TIM-Färbungen wurden beide Fixierungen ausprobiert. Eventuell noch vorhandene Tracheen wurden einen Tag später in PB entfernt und anschließend die Gehirne nochmals drei bis vier Tage in Zamboni's Fixativ bzw. PFA weiterfixiert.

## 2.4.2 Einbetten der fixierten Bienenhirne

Bienenhirne, die auf ihre Oszillation der PDF-Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden (Experiment 1 bis 4), sowie Bienenhirne, in denen CRY-, PER- und TIM-Neurone lokalisiert werden sollen (Exp. 5), müssen aufgrund ihrer Dicke in dünne Sektionen geschnitten werden. Um ein Schneiden möglich zu machen, ist es nötig, die Gehirne vorher einzubetten. Dieser Schritt entfällt bei Ganzhirnen.

Das Einbetten der fixierten Gehirne erfolgte in Gelatine-Albumin (Rezept in Kapitel 2.8, S. 63), das auf 42°C (maximal 50°C) erhitzt werden darf; höhere Temperaturen führen zur Denaturierung des Albumins. Dazu erwärmt man das in Zentrifugenröhrchen aufbewahrte Gelatine-Albumin in einem entsprechend temperierten Wasserbad, füllt es in ein Glas-Petrischälchen und taucht die Gehirne in luftblasenfreie Bereiche ein. Aufgrund der späteren vergleichenden Untersuchung am CLSM (siehe unten) sollten die Gehirne mit ihrer Frontalebene parallel zur Oberfläche des Einbettmediums ausgerichtet werden. Nach dem Erkalten schneidet man aus dem Gelatine-Albumin mithilfe einer Bügelklinge die Gehirne in Form kleiner Quader heraus und schrägt für die spätere Orientierung eine

Ecke des Blockchens ab. Die Probenblockchen wurden anschließend zum Erhärten in Paraformaldehyd (4 % PFA) bei 4°C über Nacht fixiert.

### 2.4.3 Schneiden am Vibratom

Die Blockchen werden mit Sekundenkleber auf den Probentisch geklebt und in die Pufferwanne des Vibratoms eingesetzt (Abb. 2.4). Nach dem Auffüllen der Wanne mit PB wurden sie je nach Versuch in 60, 80 oder 100 µm dicke Scheiben geschnitten (vgl. 2.1.1; 2.1.2) und unter Beachtung der Reihenfolge in die mit PB gefüllten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt.



Abb. 2.4: Schneiden am Vibratom

## 2.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, das zum Nachweis bzw. zur Lokalisierung spezifischer Proteine in einer Gewebeprobe eingesetzt wird. Dabei spielt das nachzuweisende Protein die Rolle eines Antigens. Ein primärer Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein und bildet einen Antigen-primärer Antikörper-Komplex. Um diesen sichtbar zu machen, wird anschließend ein sekundärer Antikörper zugegeben, der sowohl den primären Antikörper erkennt als auch ein Nachweissystem, z. B. Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome), trägt. Fluoreszenzmarkierte Antikörper werden unter einem Lasermikroskop (vgl. 2.6) mit definierten Wellenlängen angeregt (je nach Absorptionsmaximum des gekoppelten Nachweissystems) und emittieren wiederum eine bestimmte Wellenlänge (Emissionsmaximum). Ein Detektor am Mikroskop registriert die Emission. Die gefärbten Präparate können gescannt und digitalisiert, an einem Bildschirm angesehen oder im Computer gespeichert werden (Clark und Pazdernik, 2009).

### 2.5.1 Immunhistochemisches Färben der Bienegehirne

Die folgende Beschreibung gilt für geschnittene Präparate genauso wie für Ganzhirne. Einzelne Abweichungen in der Anzahl der Behandlungsschritte, in deren Dauer sowie die jeweiligen Konzentrationen der Lösungen sind in den Färbeprotokollen (siehe 2.5.2) explizit aufgeführt. Das Grundprinzip der Färbungen bleibt gleich.

Der **immunhistochemische Färbeprozess** beginnt im Anschluss an das Schneiden bzw. bei Ganzhirnen im Anschluss an die Fixierung mit dem Auswaschen des Fixans. Durch

mehrmaliges **Spülen** mit PB (0,1 M Phosphatpuffer) bei Raumtemperatur wird es gründlich ausgewaschen. Nachfolgendes analoges Behandeln mit PBT (PB mit Triton X) macht die Membranen der Neurone durchlässiger und damit das zu lokalisierende Antigen bzw. Protein zugänglich für den Antikörper.

Für die **Präinkubation** werden entweder zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C alle unspezifischen Proteine mit Blocking Solution abgeblockt, d. h. unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert. Dazu verwendet man ein Normalserum aus der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper stammt. Ist der Sekundärantikörper beispielsweise aus der Ziege (engl. *goat*), dann erfolgt die Präinkubation mit Normal Goat Serum (NGS).

Nach dem Entfernen der Blocking Solution findet der **erste Inkubationsschritt** mit dem primären Antikörper statt. Die je nach Färbung verwendeten Antikörper sowie die unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen sind den Färbeprotokollen zu entnehmen (2.5.2). Bei längeren Inkubationszeiten muss durch Zugabe von Natriumazid ein Wachstum von z. B. Bakterien verhindert werden. Die Reaktionszeit richtet sich nach der Dicke der Präparate. 60 bis 100 µm dicke Schnitte lässt man mindestens 48 Stunden, ganze Bienenhirne vier bis fünf Tage inkubieren. Die Antikörpermenge ist abhängig von der Größe der Probe; das Präparat sollte vollständig in der Reaktionsflüssigkeit eintauchen. Die Markierung erfolgt bei 4°C. Bei dieser Temperatur bindet der Antikörper zwar langsam an sein Antigen, dafür sehr spezifisch. Besser jedoch wären höhere Temperaturen (in der Natur Körpertemperatur). Daher wurden beide Methoden kombiniert: zuerst bei 4°C für 48 Stunden bzw. vier bis fünf Tage inkubieren, anschließend zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur (Helfrich-Förster, 2007b). Parafilm, um den Deckel der Mikrotiterplatte gewickelt, verhindert ein Austrocknen der Schnitte während langer Reaktionszeiten.

Vor dem Zufügen des Sekundärantikörpers wird der erste Antikörper mehrmals mit PBT bei Raumtemperatur gründlich **ausgewaschen**. Der primäre Antikörper kann aufgehoben und mehrmals verwendet werden. Die Spülzeiten richten sich nach der Präparatedicke.

Anschließend findet die **zweite Inkubation** mit dem Sekundärantikörper statt, der den primären Antikörper erkennt. Stammt der Primärantikörper zum Beispiel aus dem Kaninchen (*rabbit*), muss der sekundäre Antikörper aus einem anderen Tier, z. B. der Ziege (*goat*) stammen und gegen primäre „Rabbit“-Antikörper gerichtet sein (er trägt dann die Bezeichnung „Goat anti-Rabbit“). Die Dauer der Inkubation beträgt bei Schnitten 24 Stunden, bei Ganzhirnen vier bis fünf Tage. Die Inkubation erfolgt bei 4°C, zum Schluss für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur. Die Proben müssen mit Antikörperlösung bedeckt, mit Natriumazid vor Bakterienwachstum bewahrt und gegen Austrocknung mit Parafilm um-

wickelt werden. Da es sich bei dem sekundären Antikörper um ein fluoreszierendes Reagenz handelt, muss die Probe vor Licht, z. B. durch Einwickeln mit Aluminiumfolie, geschützt werden. Beim Färben von Ganzhirnen werden die „Wholemounds“ während sämtlicher Reaktionszeiten mithilfe eines Taumel Wipptischs hin und her bewegt, damit die Präparate von allen Seiten mit den Lösungen in Kontakt treten. Nach der Inkubation wird überschüssiger fluoreszierender Antikörper mehrmals mit PBT **ausgewaschen**.

Für die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks im Ganzhirn (**Exp. 6**) muss zur genauen Orientierung zusätzlich der **Hintergrund** (die Neuropile) angefärbt werden. Dazu verwendet man z. B. Luzifer Yellow. Dieses wird für eine weitere Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend muss überschüssiger Farbstoff gründlich **ausgewaschen** werden.

Schnittpräparate werden jetzt auf Objektträgern entsprechend ihrer Reihenfolge ausgerichtet und mit Vectashield für die Fluoreszenzmikroskopie **eingebettet**. Bei längerer Aufbewahrungszeit sollten die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack oder Fixogum zum Schutz vor dem Austrocknen abgedichtet werden. Ganzhirne werden mit einer aufsteigenden Ethanolreihe **entwässert**, anschließend mit Benzoessäuremethylester bei 4°C über Nacht **aufgeklart** und in Permount **eingebettet**. Die Einbettung der „Wholemounds“ erfolgt zwischen zwei Deckgläsern (Standardstärke Nr. 1: 0,13 bis 0,16 mm dick); Abstandshalter (Heftklammern, die einen Tag vor der Einbettung mit DePeX auf einem der beiden Deckgläschen festgeklebt wurden) verhindern ein Zusammendrücken des Präparats. Die fertig gefärbten Schnitte bzw. ganzen Bienengehirne werden zum Schutz vor dem Ausbleichen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### 2.5.1.1 Färbungen zur Oszillation von PDF

Die Tab. 2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und die Versuchsparameter. Für die Experimente 1 bis 4 kam immer der gleiche Antikörper zum Einsatz, lediglich die Schnittdicke sowie die Konzentration mussten angepasst werden.

Tab. 2.3: Färbeparameter für die Experimente 1 bis 4 zur Oszillation von PDF-Neuronen

	<b>Schnitte</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>Exp. 1</b>	60 µm	Rabbit anti-PDH (1:1500)	Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Exp. 2</b>	60 µm	Rabbit anti-PDH (1:1500)	Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Exp. 3</b>	100 µm	Rabbit anti-PDH (1:3000)	Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Exp. 4</b>	100 µm	Rabbit anti-PDH (1:3000)	Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200)

Abk.: PDH = Pigment-Dispersing Hormone

Leider fielen die Färbeintensitäten in den von mir selbst gefärbten Bienengehirnen im zweiten Experiment deutlich stärker aus (die Färbung war mit 255 Pixel gesättigt) als die

in dem früher, nicht von mir gefärbten ersten und halben zweiten Experiment. Dadurch musste erstens die Primärantikörper-Konzentration noch einmal ermittelt, zweitens die Auswertungsmethode in diesen intensiv gefärbten Bereichen angepasst werden (Methode mittels „squares“ in Kapitel 2.7.1.2). Eine erneute Optimierung der Versuchsparameter für die noch folgenden Experimente ergab, dass eine anti-PDH-Konzentration von 1:3000 und eine Schnittdicke von 100 µm ausreichen.

### 2.5.1.2 Färbungen zur Lokalisation von PER-, TIM- und CRY-Neuronen

Zur Lokalisation weiterer Neurone, die die Proteine PER, TIM und/oder CRY exprimieren, wurde *Apis mellifera* zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewählt und mit aus Israel stammenden primären Apis-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt (Tab. 2.4). Zur zeitlichen Optimierung und zum besseren histologischen Vergleich wurden Mehrfachfärbungen bevorzugt. Dabei müssen die primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen und die sekundären Antikörper zudem unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren besitzen.

Tab. 2.4: Färbeparameter zur Lokalisation von TIM-, PER- und CRY-Neuronen (5. Exp.)

<b>Färbung (F.)</b>	<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>
<b>Einfach-F.</b>	• Rabbit anti-ApisTIM2 (1:50)	• Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Doppel-F.</b>	• Human anti-ApisCRY (1:50) • Sheep anti-ApisPER (1:50)	• Cy <sup>TM</sup> 3, Goat anti-Human (1:100) • DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100)
<b>Dreifach-F.</b>	• Human anti-ApisCRY (1:50) • Sheep anti-ApisPER (1:50) • Rabbit anti-ApisTIM2 (1:50)	• Cy <sup>TM</sup> 3, Goat anti-Human (1:100) • DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100) • Alexa Fluor 647, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Dreifach-F.</b>	• Human anti-ApisCRY (1:50) • Sheep anti-ApisPER (1:50) • Rabbit anti-PDH (1:3000)	• Cy <sup>TM</sup> 3, Goat anti-Human (1:100) • DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100) • Alexa Fluor 647, Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Einfach-</b>	• Sheep anti-ApisPER (1:25)	• DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100)
<b>Einfach-F., parallel dazu Doppel-F.</b>	• Sheep anti-ApisPER (1:50) • Sheep anti-ApisPER (1:50) • Rabbit anti-PDH (1:3000)	• DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100) • DyLight <sup>TM</sup> 488, Donkey anti-Sheep (1:100) • Alexa Fluor 555, Goat anti-Rabbit (1:200)

Abk.: CRY = CRYPTOCHROM; PER = PERIOD; PDH = Pigment-Dispersing Hormone; TIM = TIMELESS.

Die Einfachfärbung mit anti-TIM und die Doppelfärbung mit anti-PER / anti-CRY wurden mit in Paraformaldehyd (4 %) fixierten Proben durchgeführt (Tab. 2.2, S. 28). Da sich bei allen keine gefärbten Neurone nachweisen ließen, wurde der gleiche Versuch – dieses Mal als Dreifachfärbung – mit in Zamboni's Fixativ behandelten Proben wiederholt. Bei TIM konnte keinerlei Färbung festgestellt werden, so ersetzte man TIM gegen PDF, um zu untersuchen, ob die in dem Bereich der PDF-Zellen entdeckten PER-Neurone mit PDF-Neuronen identisch oder verschieden sind. Die Einfachfärbung mit anti-PER sollte zeigen,

ob sich die PER-Neurone auch allein anfärben lassen oder ob es sich um eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers handelt.

### 2.5.1.3 Ganzhirn-Färbungen für die dreidimensionale Rekonstruktion

Für die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks in ganzen Bienen Gehirnen müssen neben den PDF-Neuronen zusätzlich der Hintergrund bzw. die diversen Neuropile gefärbt werden, um die räumliche Lage der Zellen und den Verlauf der Fasern zuordnen zu können. Zu diesem Zweck wurden Luzifer Yellow sowie anti-Synapsin ausprobiert. Ein Versuch, die synaptischen Neuropile wie bei der Schabe (Wei et al. 2010) mit anti-Synapsin zu färben, scheiterte. Möglicherweise war dieser Antikörper, der im Regensburger Labor noch aus früheren Versuchen existierte, zu alt. Letztendlich erfolgte die Färbung der Neuropile mit fluoreszierendem Luzifer Yellow (Stewart, 1978), dessen optimale Konzentration in mehreren Versuchen austariert wurde.

Tab. 2.5: Färbeparameter für die 3D-Rekonstruktion des PDF-Netzwerks im Ganzhirn

	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper / Hintergrund</b>
<b>Ganzhirn</b>	Rabbit anti-PDH (1:3000)	Alexa Fluor 555, Goat anti-Rabbit (1:200) Luzifer Yellow (1:28000)
	Rabbit anti-PDH (1:3000) Mouse anti-Synapsin nc82 (1:200)	Alexa Fluor 488, Goat anti-Rabbit (1:200) Alexa Fluor 555, Goat anti-Mouse (1:200)

Abk.: PDH = Pigment-Dispersing Hormone

Bei ganzen Gehirnen ist ein Entwässern des Gewebes mit einer aufsteigenden Ethanolreihe notwendig. Anschließendes Behandeln zuerst mit einer 50:50-Mischung aus Ethanol:Methylbenzoat, dann mit 100 % Methylbenzoat (entspricht Benzoesäuremethylester) klart das Gewebe auf. Durch diese Prozedur kann später die Lichtquelle des Mikroskops tiefer in das Gehirn eindringen.

Mit dem wasserfreien Einbettmedium Permount wurden die Gehirne zwischen zwei Standard-Deckgläsern mit aufgeklebten Heftklammern als Abstandshalter eingebettet. Die Deckgläser gewährleiten durch ihre geringe Dicke, dass der Laser beim Scannen durch das Bienenhirn von oben und von unten gleichermaßen durchdringt. Die Abstandshalter verhindern ein Zusammendrücken des Präparates.

## 2.5.2 Färbeprotokolle

In den Färbeprotokollen ist jeweils nur ein Beispiel für eine Einfach-, eine Doppel- und eine Dreifachfärbung ausführlich dargestellt (in der Übersichtstabelle Tab. 2.6 mit Sternchen\* markiert). Der nachfolgenden Tabelle sind die Änderungen für die entsprechende Färbung zu entnehmen und im Protokoll an der erforderlichen Stelle auszutauschen. Die Färbeprotokolle für die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks in Ganzhirnen (einmal mit Luzifer Yellow, einmal mit anti-Synapsin) sind vollständig aufgeführt.

Tab. 2.6: Unterschiedliche Färbeparameter zwischen allen Versuchen

<b>Färbung</b>	<b>Fix</b>	<b>Block</b>	<b>AK1 (Inkubation 1)</b>	<b>AK2 (Inkubation 2)</b>
<b>Einfachfärbungen</b>				
* <b>anti-PDH</b>	ZaF	NGS	Rabbit anti-PDH (1:1500 oder 1:3000)	Alexa 488 Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>anti-TIM</b>	PFA	NGS	Rabbit anti-ApisTIM (1:50)	Alexa 488 Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>anti-PER</b>	ZaF	NDS	Sheep anti-PER (1:25)	DyLight™ 488 Donkey anti-Sheep (1:100)
<b>Doppelfärbungen</b>				
* <b>anti-PER</b> <b>anti-CRY</b>	PFA	NDS NGS	Sheep anti-PER (1:50) Human anti-CRY (1:50)	DyLight™ 488 Donkey anti-Sheep (1:100) Cy™ 3, Goat anti-Human (1:100)
<b>anti-PER</b> <b>anti-PDH</b>	ZaF	NDS NGS	Sheep anti-PER (1:50) Rabbit anti-PDH (1:3000)	DyLight™ 488 Donkey anti-Sheep (1:100) Alexa 647 Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>Dreifachfärbungen</b>				
* <b>anti-CRY</b> <b>anti-PER</b> <b>anti-TIM</b>	ZaF	NDS NGS	Human anti-CRY (1:50) Sheep anti-PER (1:50) Rabbit anti-ApisTIM (1:50)	Cy™ 3, Goat anti-Human (1:100) DyLight™ 488 Donkey anti-Sheep (1:100) Alexa 647 Goat anti-Rabbit (1:200)
<b>anti-CRY</b> <b>anti-PER</b> <b>anti-PDH</b>	ZaF	NDS NGS	Human anti-CRY (1:50) Sheep anti-PER (1:50) Rabbit anti-PDH (1:3000)	Cy™ 3, Goat anti-Human (1:100) DyLight™ 488 Donkey anti-Sheep (1:100) Alexa 647 Goat anti-Rabbit (1:200)

Abk.: AK = Antikörper; Block = Blocken bei der Präinkubation; CRY = CRYPTOCHROM; Fix = Fixativ für das präparierte Bienenhirn; NDS/NGS = Normal Donkey/Goat Serum; PDH = Pigment-Dispersing Hormone; PER = PERIOD; PFA = Paraformaldehyd; TIM = TIMELESS; ZaF = Zamboni's Fixativ. Die mit einem \* Sternchen versehenen Färbungen sind als vollständiges Färbeprotokoll auf den folgenden Seiten aufgeführt, bei den anderen Färbungen müssen die entsprechenden Reagenzien anhand dieser Tabelle ausgetauscht werden.

Verwendete Reagenzien, Rezepte für deren Herstellung sowie alle sonstigen Materialien sind unter Kapitel 2.8 ab Seite 63 aufgelistet.

<b>Färbeprotokoll für Einzelfärbung anti-PDH</b>		
<b>1. Präparation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bienenköpfe in Paraffin befestigen</li> <li>• in Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) Gehirne herauspräparieren</li> <li>• in Blockschälchen mit PB Tracheen entfernen</li> </ul>	
<b>2. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit Zamboni's Fixativ</li> </ul>	mindestens 24 Std. bei 4°C
<b>3. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Gelatine-Albumin</li> </ul>	42°C, max. 50°C
<b>4. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)</li> </ul>	mind. über Nacht, 4°C
<b>5. Vibratom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in PB schneiden</li> <li>• Sektionen überführen in Mikrotiterplatte mit PB</li> </ul>	Schnittdicke 60 oder 100 µm (je nach Experiment)
<b>6. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 x mit PB</li> <li>• 3 x mit PBT (PB mit 0,5 % Triton X-100)</li> </ul>	jeweils 15 Min., pro Schnitt 200 µl
<b>7. Präinkubation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Blocking Solution: 4 % Normal Goat Serum (NGS), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>8. Inkubation 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit primärem Antikörper (AK 1): anti-PDH (Rabbit anti-PDH, 1:1500), NGS (2 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	mind. 48 Std., 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>9. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., je 200 µl
<b>10. Inkubation 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit sekundärem Antikörper (AK 2): Alexa 488 Goat anti-Rabbit (1:200), NGS (2 %), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, im Dunkeln
<b>11. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., je 200 µl
<b>12. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausrichten der Sektionen auf Objektträgern</li> <li>• Einbetten in Vectashield</li> </ul>	aufbewahren bei 4°C im Dunkeln



<b>Färbeprotokoll für Doppelfärbung anti-ApisPER und anti-ApisCRY</b>		
<b>1. Präparation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bienenköpfe in Paraffin befestigen</li> <li>• in Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) Gehirne herauspräparieren</li> <li>• in Blockschälchen mit PB Tracheen entfernen</li> </ul>	
<b>2. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)</li> </ul>	mindestens 24 Std. bei 4°C
<b>3. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Gelatine-Albumin</li> </ul>	42°C, max. 50°C
<b>4. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)</li> </ul>	mind. über Nacht, 4°C
<b>5. Vibratom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in PB schneiden</li> <li>• Sektionen überführen in Mikrotiterplatte mit PB</li> </ul>	Schnittdicke 80 µm
<b>6. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 x mit PB</li> <li>• 3 x mit PBT (PB mit 0,5 % Triton X-100)</li> </ul>	jeweils 15 Min., pro Schnitt 200 µl
<b>7. Präinkubation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Blocking Solution: 2 % Normal Goat Serum (NGS) und 2 % Normal Donkey Serum (NDS), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>8. Inkubation 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit primären Antikörpern (AK 1): anti-PER (Sheep anti-PER, 1:50), anti-CRY (Human anti-CRY, 1:50), NGS (1 %), NDS (1 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	mind. 48 Std, 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>9. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., 200 µl
<b>10. Inkubation 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit sekundären Antikörpern (AK 2): DyLight™ 488 (Donkey anti-Sheep, 1:100), Cy™ 3 (Goat anti-Human, 1:100), NGS (1 %), NDS (1 %), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, im Dunkeln
<b>11. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., 200 µl
<b>12. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausrichten der Sektionen auf Objektträgern</li> <li>• Einbetten in Vectashield</li> </ul>	aufbewahren bei 4°C im Dunkeln

<b>Färbeprotokoll für Dreifachfärbung anti-ApisPER, anti-ApisCRY, anti-ApisTIM2</b>		
<b>1. Präparation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bienenköpfe in Paraffin befestigen</li> <li>• in Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) Gehirne herauspräparieren</li> <li>• in Blockschale mit PB Tracheen entfernen</li> </ul>	
<b>2. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit Zamboni's Fixativ</li> </ul>	mindestens 24 Std. bei 4°C
<b>3. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Gelatine-Albumin</li> </ul>	42°C, max. 50°C
<b>4. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)</li> </ul>	mind. über Nacht, 4°C
<b>5. Vibratom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in PB schneiden</li> <li>• Sektionen überführen in Mikrotiterplatte mit PB</li> </ul>	Schnittdicke 80 µm
<b>6. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 x mit PB</li> <li>• 3 x mit PBT (PB mit 0,5 % Triton X-100)</li> </ul>	jeweils 15 Min., pro Schnitt 200 µl
<b>7. Präinkubation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Blocking Solution: 2 % Normal Goat Serum (NGS) und 2 % Normal Donkey Serum (NDS), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>8. Inkubation 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit primären Antikörpern (AK 1): anti-PER (Sheep anti-PER, 1:50), anti-CRY (Human anti-CRY, 1:50), anti-TIM (Rabbit anti-TIM, 1:50), NGS (1 %), NDS (1 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	mind. 48 Std, 4°C, pro Schnitt 100 µl
<b>9. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., 200 µl
<b>10. Inkubation 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit sekundären Antikörpern (AK 2): DyLight™ 488 (Donkey anti-Sheep, 1:100), Cy™ 3 (Goat anti-Human, 1:100), Alexa 647 (Goat anti-Rabbit, 1:200), NGS (1 %), NDS (1 %), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, im Dunkeln
<b>11. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 x mit PBT</li> </ul>	je 15 Min., 200 µl
<b>12. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausrichten der Sektionen auf Objektträgern</li> <li>• Einbetten in Vectashield</li> </ul>	aufbewahren bei 4°C, im Dunkeln

<b>Färbeprotokoll für anti-PDH und Luzifer Yellow – Ganzhirne</b>		
<b>1. Präparation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bienenköpfe in Paraffin befestigen</li> <li>• in Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) Gehirne herauspräparieren</li> <li>• in Blockschale mit PB Tracheen entfernen</li> </ul>	
<b>2. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit Zamboni's Fixativ</li> </ul>	mind. 24 Std., bei 4°C
<b>3. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 x mit PB</li> <li>• 5 x mit PBT (PB mit 0,5 % Triton X-100)</li> </ul>	je 15 Min., pro Gehirn 200 µl
<b>4. Präinkubation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Blocking Solution: 4 % Normal Goat Serum (NGS), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, 200 µl/Gehirn, Wipp-Schüttler
<b>5. Inkubation 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit primärem Antikörper (AK 1): anti-PDH (Rabbit anti-PDH, 1:3000) NGS (2 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	mind. 4 Tage, 4°C, 200 µl/Gehirn, Wipp-Schüttler
<b>6. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 x mit PBT</li> </ul>	1 x 15, 5 x 30 Min., mind. je 200 µl
<b>7. Inkubation 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit sekundärem Antikörper (AK 2): Alexa 555 Goat anti-Rabbit (1:200), NGS (2 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	4–5 Tage, 4°C, 200 µl/Gehirn, im Dunkeln, Wipp-Schüttler
<b>8. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 x mit PBT</li> </ul>	siehe Punkt 6.
<b>9. Hintergrund färben</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Lucifer Yellow CH dilithium salt (1:28 000) in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, 200 µl/Gehirn, im Dunkeln, Wipp-Schüttler
<b>10. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 x mit PBT</li> </ul>	siehe Punkt 6.
<b>11. Entwässern</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit aufsteigender Ethanolreihe: 30, 50, 70, 90, 95, 3 x 100 %</li> </ul>	je 20 Min., je mind. 200 µl
<b>12. Aufklaren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 x 50:50 Ethanol:Benzoessäuremethylester</li> <li>• 1 x 100 % Benzoessäuremethylester</li> </ul>	20 Min. mind. 45 Min. oder über Nacht
<b>13. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einbetten in Permout auf Deckgläschen mit Abstandshaltern</li> </ul>	aufbewahren bei 4°C im Dunkeln

<b>Färbeprotokoll für anti-PDH und nc82 anti-Synapsin – Ganzhirne</b>		
<b>1. Präparation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bienenköpfe in Paraffin befestigen</li> <li>• in Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) Gehirne herauspräparieren</li> <li>• in Blockschälchen mit PB Tracheen entfernen</li> </ul>	
<b>2. Fixierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Schnappdeckelgläschen mit Zamboni's Fixativ</li> </ul>	mindestens 24 Std. bei 4°C
<b>3. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 x mit PB</li> <li>• 5 x mit PBT (PB mit 0,5 % Triton X-100)</li> </ul>	je 15 Min., pro Gehirn 200 µl
<b>4. Präinkubation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Blocking Solution: 4 % Normal Goat Serum (NGS), in PBT</li> </ul>	über Nacht, 4°C, pro Gehirn 200 µl, Wipp-Schüttler
<b>5. Inkubation 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit primären Antikörpern (AK 1): anti-PDH (Rabbit anti-PDH, 1:3000), nc82 (mouse anti-Synapsin, 1:200), NGS (2 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	mind. 4 Tage, 4°C, pro Gehirn 200 µl, Wipp-Schüttler
<b>6. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 x mit PBT</li> </ul>	1 x 15, 5 x 30 Min., mind. jeweils 200 µl
<b>7. Inkubation 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit sekundären Antikörpern (AK 2): Alexa 488 Goat anti-Rabbit (1:200), Alexa 555 Goat anti-Mouse (1:200), NGS (2 %), Natriumazid (0,02 %), in PBT</li> </ul>	4–5 Tage, 4°C, pro Gehirn 200 µl, im Dunkeln, Wipp-Schüttler
<b>8. Spülen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 x mit PBT</li> </ul>	siehe Punkt 6.
<b>9. Entwässern</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit aufsteigender Ethanolreihe: 30, 50, 70, 90, 95, 3 x 100 %</li> </ul>	jeweils 20 Min., jeweils mind. 200 µl
<b>10. Aufklaren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 x 50:50 Ethanol:Benzoessäuremethylester</li> <li>• 1 x 100 % Benzoessäuremethylester</li> </ul>	20 Min. mind. 45 Min. oder über Nacht
<b>11. Einbetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einbetten in Permout auf Deckgläschen mit Abstandshaltern</li> </ul>	aufbewahren bei 4°C im Dunkeln

## 2.6 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die gefärbten Bienengehirne wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM, „c“ für engl. *confocal*) analysiert. Bei diesem Mikroskop fungiert ein Laser als Lichtquelle, der mit einer bestimmten Wellenlänge die fluoreszierenden Antikörper des Präparates anregt. Das für die gefärbten Schnitte verwendete CLSM (Zeiss) verfügt über drei Laser mit verschiedenen Anregungswellenlängen (Argon mit 488 nm, HeliumNeon (HeNe) 1 mit 543 nm sowie HeNe 2 mit 633 nm). Somit können Präparate mit drei verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen, sogenannte Dreifachfärbungen, in einer einzigen Probe gleichzeitig untersucht werden.

Das Prinzip des konfokalen Verfahrens beruht darauf, dass die Lichtquelle (Laser) nicht wie bei einem üblichen Lichtmikroskop das ganze Sehfeld im Mikroskop ausleuchtet, sondern nur einen Brennpunkt fokussiert. Dadurch wird das Streulicht benachbarter Punkte, das zu Unschärfe führen würde, unterdrückt. Die von den Fluorochromen reflektierte oder emittierte Strahlung (Emissionsstrahlung) wird von einem Detektor farbselektiv registriert. Die folgende Tabelle gibt an, mit welchem farblichen Kanal die jeweilige Färbung dargestellt wurde. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der sekundären Antikörper sind ebenfalls aufgeführt.

Tab. 2.7: Farbliche Kanäle, Absorptions- (Amax.) sowie Emissionsmaxima (Emax.) für die verschiedenen sekundären Antikörperfärbungen (AK 2).

<b>Experimente</b>		<b>Färbung, in Klammern AK 2</b>	<b>Amax.</b>	<b>Emax.</b>	<b>Kanal</b>
<b>Exp. 1 bis 4</b>		• PDF (Alexa Fluor 488 nm)	495 nm	519 nm	grün
<b>Exp. 5</b>	<b>Einfachfärbung</b>	• TIM (Alexa Fluor 488 nm)	495 nm	519 nm	grün
	<b>Doppelfärbung</b>	• CRY (Cy 3) PER (DyLight 488 nm)	550 nm 493 nm	570 nm 518 nm	rot grün
	<b>Dreifachfärbung</b>	• CRY (Cy 3) PER (DyLight 488 nm) TIM (Alexa Fluor 647 nm)	550 nm 493 nm 650 nm	570 nm 518 nm 665 nm	rot grün blau
	<b>Dreifachfärbung</b>	• CRY (Cy 3) PER (DyLight 488 nm) PDF (Alexa Fluor 647 nm)	550 nm 493 nm 650 nm	570 nm 518 nm 665 nm	rot grün blau
<b>Exp. 6 Ganzhirn-Färbungen</b>		• PDF (Alexa Fluor 555 nm) Neuropile (Luzifer Yellow) • PDF (Alexa Fluor 488 nm) nc82 (Alexa Fluor 555 nm)	555 nm 425-430 nm 495 nm 555 nm	565 nm 515-520 nm 519 nm 565 nm	rot grün grün rot

Abk.: AK = Antikörper; CRY = CRYPTOCHROM; PER = PERIOD; PDH = Pigment-Dispersing Hormone; TIM = TIMELESS.

Bei dicken Präparaten würden Lichtpunkte ober- und unterhalb der eingestellten Ebene zu weiterer Streuung führen (Robenek, 1995). Die Konfokalität besteht nun andernteils in einer zusätzlichen Blende (Detektorpinhole), die je nach Einstellung ihres Durchmessers

nur das emittierte Fluoreszenzlicht aus einer Brennebene zum Detektor passieren lässt. Lichtstrahlen aus der darüber- bzw. darunterliegenden Schicht können somit abgeschirmt werden. Bewegliche Spiegel lassen das Anregungslicht in jeder Ebene rasterförmig über das zu mikroskopierende Objekt fahren und erzeugen so über einen Stapel (*stack*) aus mehreren xy-ausgerichteten Bildern (*slices*) ein dreidimensionales Bild.

Bei der quantitativen Untersuchung der Oszillation der PDF-Neurone erfolgte das Scannen der Präparate immer mit den gleichen Einstellungen am CLSM. Die Werte für die Stärke des Argon-Lasers, des Detector Gains, des Amplifier Offsets sowie für das Intervall der einzelnen Scannschichten wurden konstant gehalten.

Die Ganzhirne wurden zunächst mit dem CLSM 510 (Zeiss) gescannt. Leider übermittelte der Detector Gain bei derart dicken Präparaten nach einiger Zeit kein Signal mehr, d. h. der grüne Kanal verschwand vollständig. Wegen dieser technischen Probleme wurde auf ein Laser-Rastermikroskop DM 5500 Q von Leica an der Würzburger Julius-Maximilians-Universität ausgewichen. Die Anregungslaser entsprachen 488 nm für die Neuropilfärbung mit Luzifer Yellow und 532 nm für die PDF-Färbung mit Alexa Fluor 555. Zusätzlich verfügte das Leica-Mikroskop über einen automatisch verstellbaren Objektisch, der das für ein Einzelbild zu große Bienen Gehirn aus 3 x 2 im Rechteck liegenden Bildstapeln mikroskopgesteuert zusammensetzte. Die Software verband anschließend die einzelnen Stapel zu einem großen Bild. Für die Rekonstruktion mussten die gescannten Bildstapel in ein für das Computerprogramm Amira<sup>®</sup> lesbares Format (\*.tif) umgewandelt und exportiert werden.

## 2.7 Quantitative und qualitative Untersuchungen

### 2.7.1 Quantitative Untersuchung der Oszillation in den PDF-Neuronen

In den ersten vier Experimenten (2.1) sollten Sammlerinnen und Stockbienen auf eine mögliche Oszillation in ihrer PDF-Expression in verschiedenen Regionen des Gehirns zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantitativ verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden pro Zeitpunkt nach Möglichkeit mindestens acht Bienen präpariert und gefärbt. Für eine quantitative Aussage ist eine gleichbleibende Behandlung aller Proben entscheidend. Da zum einen ein kontinuierliches Ausbleichen der Fluorochrome in den gefärbten Schnitten nicht auszuschließen ist, zum anderen aus Zeitgründen nicht alle Gehirne auf einmal gescannt werden können, wurden pro Scannreihe immer sechs Gehirne, von jedem Zeitpunkt jeweils eines, bearbeitet.

### 2.7.1.1 Die zu untersuchenden Bereiche im Gehirn der Honigbiene

In Abb. 2.5 sind die Zellen (*Cells*) und die Faserareale (*Fibers*) im anterioren (A–C) und posterioren (D) Bienengehirn gezeigt, die für den quantitativen Vergleich ausgewählt wurden. Die Faserbereiche bekamen eine Nummer zugewiesen (Tab. 2.8).

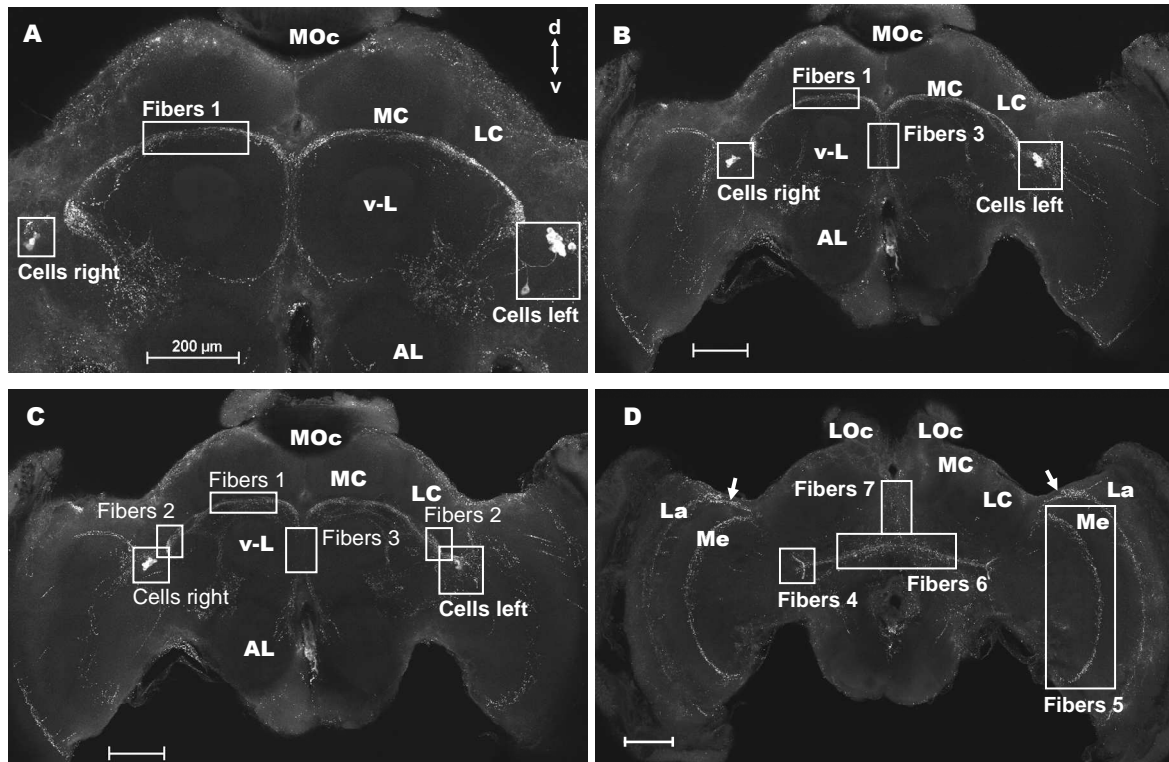


Abb. 2.5: Die zur Oszillation und Quantität untersuchten Bereiche anterior (A) bis posterior (D) im Gehirn von *Apis mellifera*. Frontalschnitte, Ausrichtung siehe Bild A, Messbalken = 100 µm (in A 200 µm). Bild D, weiße Pfeile: dorsaler Übergang der PDF-Neuriten zwischen La und Me.  
Abk.: AL = Antennallobus, MOC/LOC = medianer/lateraler Ocellus, MC/LC = medianer/lateraler Calyx, La = Lamina, Me = Medulla, v-L = vertikaler Lobus.

Tab. 2.8: Die quantifizierte Faserbereiche in *Apis mellifera*

<b>Fasern</b>	<b>Bereich: Neuriten(,) ...</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>1</b>	zwischen Calyces und v-Loben in latero-medianer Ausrichtung;	Unterscheidung zwischen links und rechts.
<b>2</b>	die lateral von den PDF-Somata kommend in die Protocerebrallappen eintreten;	Eindeutige Zuweisung war nicht möglich, die Färbeintensität immer gesättigt. Wurde nicht weiter untersucht.
<b>3</b>	im „ <i>median bundle</i> “ (MBu);	Keine Unterscheidung links – rechts.
<b>4</b>	die zwischen „ <i>central brain</i> “ und Lobula verlaufen („Loop“);	Unterscheidung zwischen links und rechts.
<b>5</b>	in der „ <i>serpentine layer</i> “ der Medulla;	Unterscheidung zwischen links und rechts.
<b>6</b>	in der „ <i>posterior optic commissure</i> “ (POC);	Keine Unterscheidung links – rechts.
<b>7</b>	die in die Ozellen ziehen.	Keine Unterscheidung links – rechts.

### 2.7.1.2 Datenerhebung mit ImageJ

Mit dem Computerprogramm NIH ImageJ (Version 1.40g) wurden die Parameter Färbintensität der PDF-Zellen und -Fasern sowie Größe und Anzahl der PDF-Zellen bestimmt. Dazu wurden die mit dem LSM Browser gescannten Bildstapel (*stacks*) in ImageJ geöffnet und in Graustufen (8-bit) umgewandelt. Für die Ermittlung der Färbintensitäten wählte man einzelne Schnitte (*slices*) innerhalb der „Stacks“ nach folgenden Kriterien aus:

Für die Bestimmung der **Färbintensitäten in den PDF-Zellen** wurde für jede Zelle die Ebene ausgewählt, in der ihr Zellkern scharf und ihre Färbung im Zytoplasma am stärksten zu sehen sind. In diesem „Slice“ erfolgte die Messung der mittleren Färbintensität (→ *mean grey value*) des Zytoplasmas in Pixel und der „**Schnittfläche**“ in dieser Ebene (→ *area*) in Quadratmikrometer. Zu Anfang wurden pro Zelle drei Messungen durchgeführt, die wegen sehr geringer Abweichungen (max. 5 Pixel) auf eine reduziert wurden. Zusätzlich erfolgten zehn Hintergrundmessungen. Außerdem wurde die Anzahl der gefärbten Zellen notiert.

Für die Ermittlung der **Färbintensitäten in den PDF-Fasern** wählte man den „Slice“, in dem die Färbung aller Fasern des im Interesse liegenden Areals am intensivsten erschien. Innerhalb dieses Bereichs wurden die je nach Experiment 10 bis 30 höchsten Messungen notiert. Auch hier wurden parallel zehn Hintergrundmesswerte bestimmt.

[Eine von der üblichen Methode abweichende Ermittlung der Färbintensitäten in den PDF-Fasern wurde für die zu intensiv gefärbten Präparate des zweiten Experiments entwickelt (siehe Erklärung in Kapitel 2.5.1.1). Die mittlere Färbintensität betrug in diesen Fällen zu allen Zeitpunkten die maximale Pixelzahl von 255, die möglicherweise jedoch nicht auf eine fehlende Oszillation zurückzuführen war, sondern auf eine zu hohe Konzentration an primärem Antikörper im Färbeprozess. Ziel war es, für diese speziellen Bereiche eine andere Auswertungsmethode zu entwickeln, die noch einen Vergleich mit den früheren Daten zuließ und gleichzeitig den mittleren Intensitätswert in seiner Skalierung nach unten drückte. Dazu wurde ein Quadrat (**square**) von 5 x 5 Pixel über den zu messenden Faserbereich gelegt und der mittlere Intensitätswert der ganzen Fläche (→ *mean grey value*) gemessen. Es wurden die 30 höchsten Daten notiert und der Hintergrund abgezogen.]

Die Skalierung bei der Intensitätsmessung reicht von 0 (entspricht keiner Färbung bzw. schwarz) bis 255 (intensivste Färbung bzw. weiß) Pixel.



### 2.7.1.3 Auswertung mit Excel und Statistik

Die mit ImageJ erhobenen Daten (2.7.1.2) wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel (Version 2003) weiterverarbeitet.

Für jede Biene sind alle Messwerte sowohl für die linke als auch rechte Gehirnhälfte erfasst und getrennt deren Mittelwerte erhoben worden. Der Zahlenwert für das ganze Gehirn (*both hemispheres*) errechnet sich aus den jeweils getrennt ermittelten Daten. Der gemittelte Hintergrund wurde abgezogen. Schließlich wurden alle Bienen eines Zeitpunkts zusammengefasst und der Mittelwert gebildet. Das Ergebnis ist pro Zeitpunkt die **mittlere Färbeintensität** in Pixel, die grafisch auf der y-Achse gegen die Zeitgeber Time (ZT) auf der x-Achse dargestellt worden ist.

Neben der Färbeintensität ermittelte man die **Anzahl** der neurosekretorischen PDF-Zellen. Auch sie wurde gemittelt und in einem Diagramm gegen ZT aufgetragen.

Außerdem wurde die Größe der PDF-Zellen über die **Fläche ihrer Querschnitte** notiert und auf mögliche Clusterbildungen geachtet.

Zum Teil wurde der **Färbeindex** (in Pixel) bestimmt. Er ist definiert als die mittlere Färbeintensität (s. o.) multipliziert mit der Anzahl gefärbter Zellen einer Biene eines Zeitpunkts, dividiert durch die Anzahl der maximal gefärbten Zellen innerhalb eines Clusters (d. h. die höchste, vorkommende Zellzahl innerhalb aller untersuchten Bienen dieses Versuchs).

$$\text{Färbeindex} = \frac{\text{Färbeintensität} \times \text{Anzahl der gefärbten Zellen}}{\text{maximale Anzahl der gefärbten Zellen}}$$

Zu allen Werten berechnete Excel die Standardabweichungen (Stabw) und den Standardfehler (SE, *standard error of mean*). In den Grafiken ist immer der SE eingefügt.

Die Daten wurden mit dem Computerprogramm SYSTAT 11 (SYSTAT Software, Inc.) mithilfe einer „One-Way“ ANOVA auf mögliche Signifikanzen getestet. Ab einem p-Wert von kleiner als 0,05 ( $p < 0,05$ ) wurde die Oszillation als signifikant gewertet. Zudem wurden die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) berechnet.

### 2.7.2 Qualitative Untersuchung der CRY-, PER- und TIM-Neurone

Für die Untersuchung der CRY-, PER- und TIM-Neurone (fünftes Experiment) wurden die am CLSM gescannten Bildstapel im LSM Image Browser (Release 4.2) geladen. Im Bereich der gefärbten Zellen wurden die betreffenden Schnittebenen mittels einer Projektion (*projection*) überlagert. Anschließendes Ein- und Ausblenden der verschiedenen Farbkanaäle lässt erkennen, ob einzelne Neurone eine oder mehrere Färbungen zeigen, ob eine speziell gefärbte Zelle identisch mit einer anders gefärbten Zelle ist oder es sich um getrennte Zellen handelt.

### 2.7.3 Die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks mit Amira®

Anhand der mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bildstapel, die aus vielen zweidimensionalen Schichten bestehen, sollte ein dreidimensionales Bild eines Honigbienengehirns (*Apis mellifera*) mit dem Computer erstellt werden. Neben den Neuropilen wurden die PDF-Neurone und ihre Neuriten – ebenfalls räumlich – nachgezeichnet. Ein Übereinandersetzen aller Rekonstruktionen auf denselben Koordinaten veranschaulicht die Lage und den Verlauf des gesamten PDF-Netzwerks im Kopf dieser Hymenoptere.

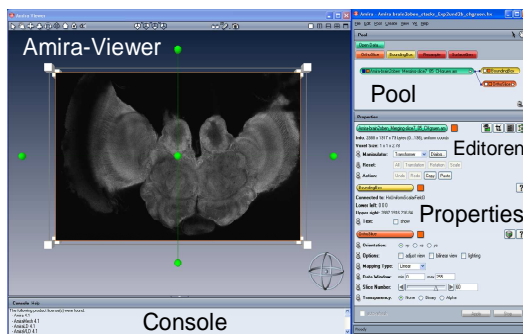


Abb. 2.6: Organisation der Amira®-Software als ein aus vier Fenstern aufgebautes Interface (Viewer, Pool, Console, Properties). Im „Pool“ befinden sich hier ein grünes Daten-Modul, ein oranges Planar-Display-Modul und ein gelbes Display-Modul. Die Eigenschaften und Einstellungsmöglichkeiten sowie die Editoren befinden sich unter „Properties“.

Die Rekonstruktion des Insektengehirns erfolgte mit der Computersoftware Amira® (Version 4.1.1). Das Programm ist aus vier Fenstern aufgebaut (Abb. 2.6): dem „**Amira-Viewer**“, der die zugrunde liegenden mikroskopischen Bildstapel oder die 3-D-Visualisierung der gezeichneten Strukturen zeigt; einer „**Console**“, die alle Vorgänge protokolliert und die Eingabe von Befehlen (in „Tool Command Language“ TCL) ermöglicht; einem „**Pool**“, in den die Daten geladen und als Module verwaltet werden sowie einer „**Properties**“-Area,

die die Eigenschaften und Bearbeitungsmöglichkeiten der im „Pool“ aktivierten Module auflistet. Im „Properties“-Fenster befinden sich die verschiedenen Editoren, z. B. der „Transform Editor“ zum Verändern der Lage-Koordinaten oder der „Crop Editor“ zum Zuschneiden der Bildstapel.

Zuerst wurden im „Pool“ die mikroskopischen Aufnahmen, die aus den relevanten Einzelschichten des Bienengehirns bestehen und im „\*.tif“-Format gespeichert wurden, entsprechend ihrer korrekten Reihenfolge geladen (→ *Open Data*). Es erscheint ein grünes Daten-Modul. Um den Inhalt dieser Funktionseinheit betrachten zu können, wird ein „OrthoSlice“ (oranges Planar-Display-Modul) geschaffen, der die betreffenden mikroskopischen Bildstapel bei Aktivierung im „Amira-Viewer“ sichtbar macht. Eine „BoundingBox“ (gelbes Display-Modul) zeigt im „Viewer“ mit einem Rahmen die Umrisse des Bildstapels an (Abb. 2.6, → im zu bearbeitenden grünen Modul – *OrthoSlice* oder *BoundingBox*).

Beim Laden, alternativ im „Crop Editor“, müssen die korrekten Werte für ein Voxel definiert werden. Die zugrunde liegenden mikroskopischen Aufnahmen besitzen laut Leica-Mikroskop-Angaben eine Voxel-Weite sowie -Höhe von je 860,2 nm (entspricht x- und y-Seite eines zweidimensionalen Pixels). Das von der Mikroskop-Software als ideal er-

mittelte Intervall zwischen zwei aufgenommenen Schichten („slices“) betrug 2,39  $\mu\text{m}$  (2391,18 nm). Bei einer von Amira® vorgegebenen Voxel-Größe für x und y von jeweils „1“ resultierte ein z-Wert (Voxel-Tiefe) von 2,78 (Eingabe Abb. 2.7).

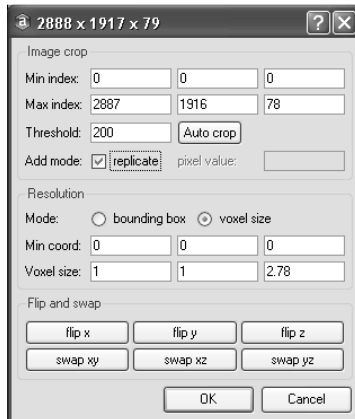


Abb. 2.7: „Crop Editor“-Eingabe: Unter „Resolution“ stehen die x-, y- und z-Werte eines Voxels. Über „Flip and swap“ wendet/dreht man die „slices“.

Für eine ideale, einfache Visualisierung sollte es sich bei den Grunddaten (grüne Daten-Module) um jeweils einen einzigen Bildstapel handeln, der das gesamte Gehirn von dorsal bis ventral präsentiert. Da der Laser des Mikroskops nicht durch das gesamte Bienenhirn scannen konnte, wurde es von zwei Seiten aufgenommen. Beide Hälften mussten parallel bearbeitet werden, bevor sie zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden konnten (vgl. 2.7.3.4). Da die Bildstapel im Mikroskop immer von oben nach unten (objektivnah nach objektivfern) gescannt wurden, musste eines der beiden Module in seinen Ausrichtungen gewendet bzw. umgedreht werden (Abb. 2.7 → *flip y*, *flip z*).

Grüne Datenmodule werden separat als „Amira Mesh Binary“ (\*.am) gespeichert und stehen somit auch in anderen Amira-Networks zur Verfügung. Die Gesamtarbeit sichert man unter „→ Save Network As ...“ als „Amira script and data files (pack & go) (\*.hx)“. Dabei bleiben die Bezüge der Module erhalten. Amira® erstellt bei diesem Speicherbefehl automatisch einen zur „\*.hx-Network“ gehörenden Ordner (\*.files), der alle Module und Bezüge beinhaltet.

### 2.7.3.1 Visualisierung der Neuropile

Für die Rekonstruktion der verschiedenen Gehirnstrukturen wurden die mit Lucifer Yellow (LY) gefärbten Bildstapel geladen. Das Reproduzieren der Neuropile erfolgte mithilfe des „Segmentation Editors“ über ein „LabelField“ (→ ▷ – *Labelling* – *LabelField*). In diesem Bearbeitungsmodus fährt man Schicht für Schicht die einzelnen Neuropilumrisse nach und weist sie einem „Material“ zu (Abb. 2.8, S. 51). Die Software interpoliert zwischen den zweidimensionalen Zeichnungen zu dreidimensionalen Gefügen. Im „Pool“ wird an das bearbeitete Daten-Modul ein grünes „\*.labels.am“-Modul fest angeheftet, das über den Editor „Image Segmentation“ weiterbearbeitet werden kann.

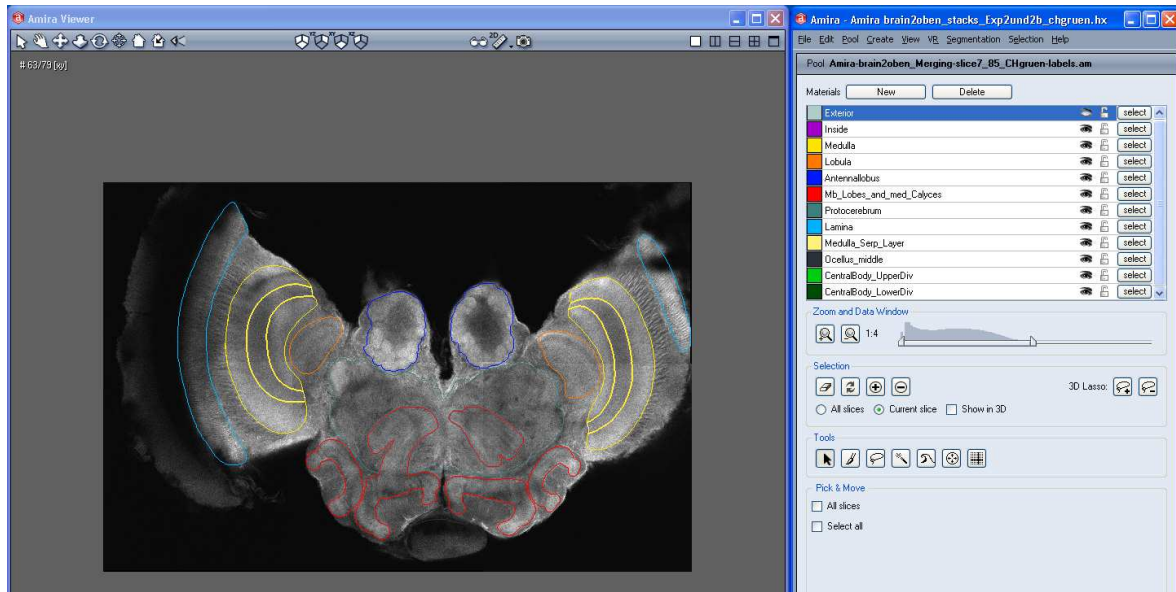


Abb. 2.8: Nachgezeichnete Neuropilstrukturen im „Segmentation Editor“. Jedem Neuropil wurde ein benutzerdefiniertes Material und eine Farbe zugewiesen.

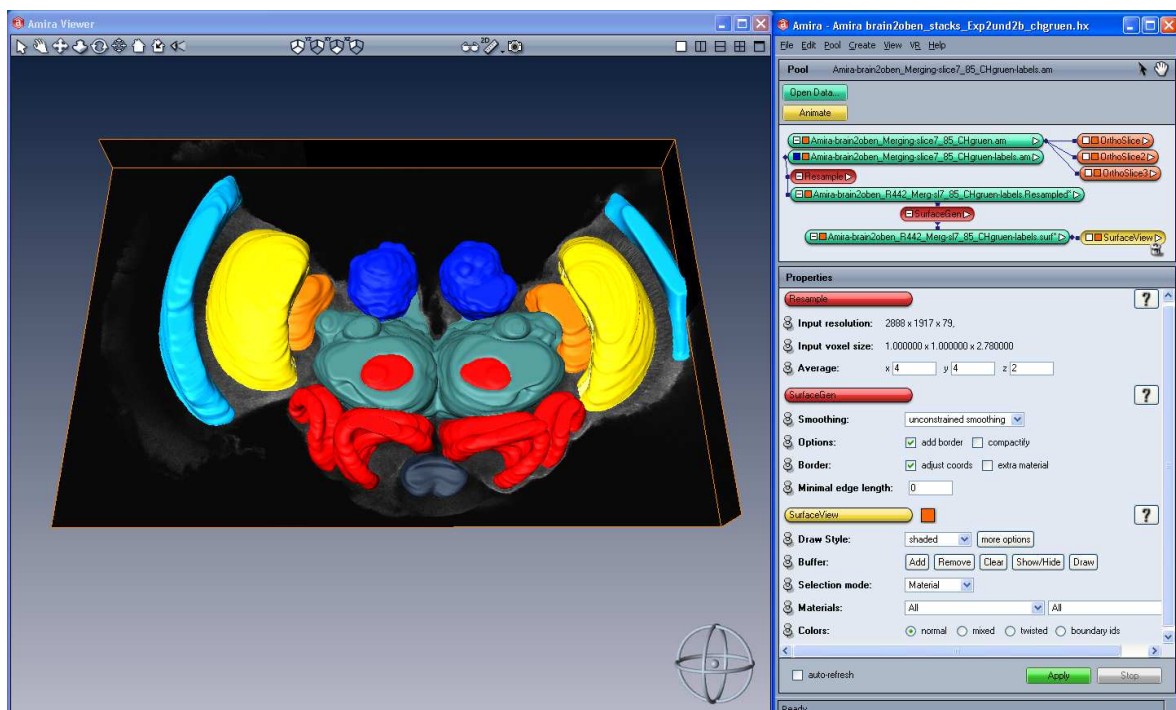


Abb. 2.9: Neuropil-Visualisierung der oberen Gehirnhälfte.

„**Pool**“: Zugrunde liegt der Originalbildstapel der oberen Neuropilhälfte (\*.am), der mithilfe „OrthoSlices“ im „Viewer“ sichtbar wird. Fest angeheftet ist das „LabelField“ (\*.labels.am) mit den gezeichneten Neuropilumrissen. Das rote „Resample“ reduziert die Auflösung; das rote „SurfaceGen“ berechnet die Rekonstruktion, die im grünen „\*-labels.surf“ gespeichert wird. Das gelbe „SurfaceView“ visualisiert die Rekonstruktion im „Viewer“.

„**Properties**“: Mithilfe des „Resamples“ wird die Auflösung halbiert (ursprünglich 2–2–1, geändert auf 4–4–2). Das „SurfaceGen“ erfolgt mit der Glättungsmethode „unconstrained smoothing“. Beim „SurfaceView“ ist hier unter „Draw Style“ „shaded“ eingegeben (alternativ „transparent“).

Amira® bietet über die Befehle aus der „Pool“-Menuleiste „→ *Selection – Interpolate*“ die Möglichkeit, einzig die erste und letzte Schicht einer zu rekonstruierenden Struktur nachzufahren, die dazwischen liegenden Ebenen zu berechnen und automatisch skizzieren zu lassen. Das spart Arbeitszeit, empfiehlt sich aber nur bei sich kontinuierlich verändernden Sequenzen. Bei einigen Neuropilen, wie zum Beispiel der Lamina oder der Lobula, wäre dieses Vorgehen denkbar gewesen, leider entpuppte sich die daraus resultierende Speichermenge als zu umfangreich.

Sind die Neuropile vollständig erfasst, visualisiert man sie wie in Abb. 2.9, S. 51 demonstriert zu dreidimensionalen Gebilden. Dazu musste bei der Biene zuerst ein „Resample“ (→ ▷ – *Compute – Resample*) durchgeführt werden, bei dem die Auflösung reduziert wird (hier: 4 – 4 – 2). Im „Pool“ zeigt sich ein neues grünes „\*-labels.Resampled“-Modul. Anschließend generiert man über „→ ▷ – *SurfaceGen*“ die Oberfläche der interpolierten Zeichnungen. Es erscheint ein weiteres Modul mit dem Suffix „\*.surf“, das die errechneten 3-D-Bilder enthält. Die über ein „SurfaceGen“ visualisierten Rekonstruktionen müssen über „→ *File – Save Data As ...*“ als „\*.surf“-Module gespeichert werden. In dieser Form können sie auch in anderen „Networks“ geladen werden.

Bei der Oberflächenberechnung wurde als Glättungsmethode „Unconstrained smoothing“ gewählt, bei der zwischen den Extremen gemittelt wird. Als Folge erscheinen relativ glatte, abgerundete Formen. Sehr dünne Formationen gehen jedoch verloren.

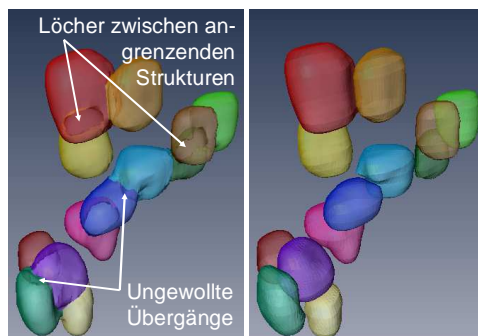


Abb. 2.10: Die „Surface Generierung“ aller Zellen in einem Arbeitsschritt (links) oder für jede Zelle einzeln (rechts). Zwischen den Zellen entstehen Artefakte, wie „Löcher“ und nicht existente Übergänge (links).

Die dreidimensionalen Nachbildungen werden im „Viewer“ über „SurfaceView“ (→ ▷ – *Display – SurfaceView*) sichtbar. Im „Properties“-Fenster sind zusätzliche Gestaltungsoptionen aufgeführt. Über „→ *more options – vertex normal*“ erfolgte eine weitere Glättung der Neuropiloberflächen. Um den Verlauf von Neuriten innerhalb der Neuropile verfolgen zu können, wurden sie durchsichtig dargestellt (→ *Draw Style – transparent*).

Werden Strukturen alle in einem „LabelField“ nachgefahren und über ein einziges „SurfaceGen“ visualisiert, zeichnet Amira® nicht existente Übergänge zwischen angrenzenden Materialien und spart Bereiche aus, an denen sich benachbarte Grenzen berühren (es entstehen Löcher, illustriert in Abb. 2.10 am Beispiel der PDF-Zellen). Diese Artefakte umgeht man, indem alle Strukturen einzeln generiert werden, also separat ein „SurfaceGen“ für jedes Material durchgeführt wird.

Daraufhin trennt die Software die Strukturen deutlich und es entstehen keine Ausparungen in den Hüllen.

Amira® bietet über „→ *Isosurface*“ einen automatischen Rekonstruktionsbefehl, der in dieser Biene keine aussagefähigen Resultate lieferte.

### **2.7.3.2 Visualisierung der Zellen**

Als Grundlage dienten die mit PDF markierten Bildstapel (vgl. 2.7.3.3: Visualisierung der Neuriten). Die Umrisse jeder Zelle wurden im „Segmentation Editor“ über ein „LabelField“ umfahren und bekamen ein eigenes „Material“ und eine Farbe zugewiesen (siehe Visualisierung der Neuropile, Kapitel 2.7.3.1).

Bei den ersten Zeichenversuchen fiel auf, dass die Formen der Zellen verhältnismäßig lang in ihrer z-Achse ausfielen. Dies rührt wahrscheinlich daher, dass die Fluoreszenzen von der darüber- und der darunterliegenden Schicht der zu zeichnenden Ebene durchstrahlen. Verringern lässt sich dieses Artefakt, indem die Anfangs- und Endabschnitte eine Nuance kleiner gemalt werden als sie im „OrthoSlice“ erscheinen.

Da es sich bei den Neuronen um sehr kleine Gebilde handelt, führt ein „Resample“ (2.7.3.1) mit einer darauffolgenden „Surface“-Generierung zu extrem eckigen Oberflächen (die Software arbeitet mit „*triangles*“). Um ein „Resample“ zu vermeiden, wurden die Bildstapel mittels des „Crop Editors“ in ihrer x-, y- und z-Ausdehnung auf möglichst kleine Ausmaße zugeschnitten. Damit das spätere Übereinandersetzen bzw. Ausrichten der Zellen, Neuropile und Neuriten leichter vonstattengeht, wurde das Zell-Modul auf der x- und z-Achse am Nullpunkt belassen. So war gewährleistet, dass alle Bilder um die gleichen Werte verschoben werden konnten und nicht für jedes eine Berechnung erfolgen musste. Das deutlich im Speicher reduzierte „Zellen-Label-Modul“ konnte nun ohne ein „Resample“ visualisiert werden. Aus dem „SurfaceGen“ resultierten deutlich glattere Zellränder. Die „Surface“-Generierungen der Zelloberflächen erfolgte mit den üblichen Einstellungen („*unconstrained smoothing*“, „*Vertex normal*“ (2.7.3.1)).

### 2.7.3.3 Visualisierung der Neuriten

Um Neuriten unter Amira® 4.1.1 zeichnen zu können, muss das Programm über ein „Neuron Tracer Plug-in“ verfügen.

Für die Rekonstruktion des PDF-Netzwerks wurden die mit PDF gefärbten Bildstapel im „Pool“ geladen. Man kreiert zunächst einen SkeletonTree (→ *Create – Skeleton – SkeletonTree*), der mit dem Daten-Modul, auf das er sich bezieht, verbunden werden muss (→ *□ im Skeleton-Modul – Data – auf Bezugsmodul ziehen*). Über den „Graph Editor“ ist schließlich das Nachfahren der fluoreszierenden Fasern möglich.

Zum Zeichnen der Neuriten wählt man nach der Aktivierung des „Add a new point or branch“-Buttons aus der „Graph Editor“-Menuleiste im „Viewer“ mit dem Curser einen Start- sowie einen Endpunkt der Faser aus (→ *Strg.-Taste + Mausklick auf Startpunkt – Strg.-Taste + Mausklick auf Endpunkt*). Amira® verknüpft die beiden Markierungen anhand eines Vergleichs von Pixelintensitäten. Die Pixel zwischen den zwei Punkten, die am intensivsten leuchten, werden durch eine Linie verbunden. Da im Kopf der Honigbiene PDF vor allem in Varikositäten gefärbt ist, resultiert eine sehr zackige Linie, die mit verschiedenen Werkzeugen geglättet (z. B. → *Strg. + F*) oder in ihrem Durchmesser angeglichen (→ *Strg. + E*) wurde (S. 55, Abb. 2.11, A-C).

Die „SkeletonTrees“ werden als „Amira Mesh“-Datei (\*.am) gespeichert. Um Fasern in verschiedenen Neuropilen gesondert kolorieren und betrachten zu können, müssen separate Skeletons (gespeichert als einzelne „\*.am“-Module) angelegt werden.

Bei der PDF-Färbung im exemplarischen Bienenhirn fällt auf, dass vorrangig die Varikositäten der Neuriten gefärbt sind. Eine Verbindung zwischen diesen Verdickungen ist wenn, dann meist schwach gefärbt. Dadurch ist es oft nicht möglich, einen eindeutigen Verlauf der Fasern festzustellen. An diesen Stellen hilft die automatische Suche der Software über die Pixelintensitäten. Andererseits gibt es Zellfortsätze, bei denen man eindeutig einen Verlauf erkennt, obwohl der Computer zwischen den gefärbten Varikositäten keine Verknüpfungen ausmacht. Diese können mit dem „Geradeaus“-Werkzeug in der „Graph Editor“-Menuleiste erzwungen werden.

Waren Zusammengehörigkeiten nicht einwandfrei zu sehen und bestätigte der Computer diese Annahme, wurden die Fasern dort unterbrochen. Es handelt sich hierbei nicht zwangsläufig um blinde Neuritenenden; eine vorhandene Konnektivität ist trotzdem möglich, nur befindet sich kein anfärbbares Material darin.



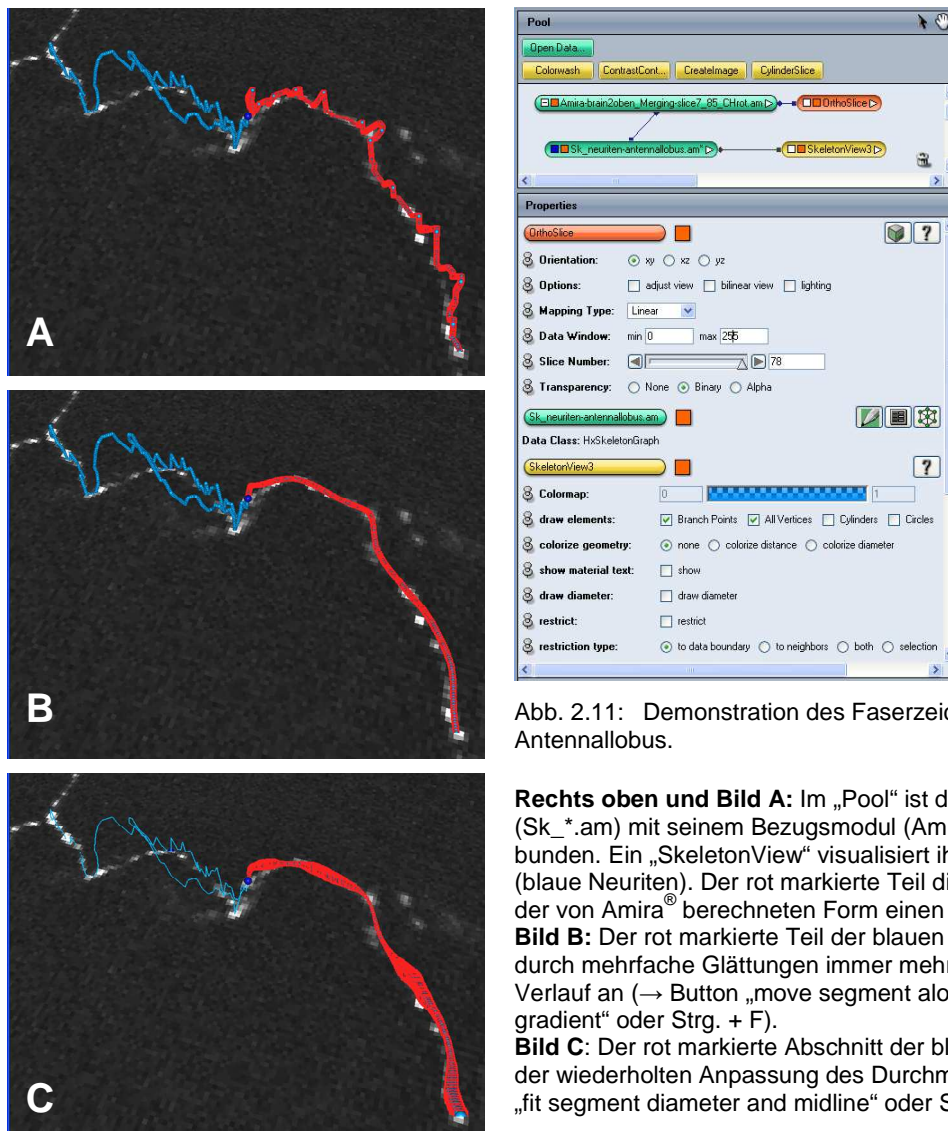


Abb. 2.11: Demonstration des Faserzeichnens im Antennallobus.

**Rechts oben und Bild A:** Im „Pool“ ist der „SkeletonTree“ (Sk\_\*.am) mit seinem Bezugsmodell (AmiraBrain2\*.am) verbunden. Ein „SkeletonView“ visualisiert ihn im „Viewer“ (blaue Neuriten). Der rot markierte Teil dieser Faser zeigt in der von Amira® berechneten Form einen zackigen Verlauf.

**Bild B:** Der rot markierte Teil der blauen Faser passt sich durch mehrfache Glättungen immer mehr dem geraden Verlauf an (→ Button „move segment along intensity gradient“ oder Strg. + F).

**Bild C:** Der rot markierte Abschnitt der blauen Faser nach der wiederholten Anpassung des Durchmessers (→ Button „fit segment diameter and midline“ oder Strg. + E).

Verbindet Amira® zwei Varikositäten, handelt es sich überwiegend um eine sehr zackige Linie. Diese Darstellung spiegelt das Problem der Software wider, eigentlich ungefärbte Bereiche zu rekonstruieren. Sind schwache Färbungen vorhanden, stellt das wahrscheinlich den „realsten“ Verlauf der Faser dar. Aufgrund des Pixelaufbaus eines Bildes wird davon ausgegangen, dass die Neuriten eckiger als in Wirklichkeit ausfallen. Zusätzlich erschweren zackige Linien im Bienenhirn, in dem extrem viele Fasern nebeneinander projizieren, deren Verfolgbarkeit. Es entsteht teilweise ein großes Durcheinander. Um trotzdem eine Art Netz, die Richtungstendenz oder die Projektion einzelner Fasern erkennen zu können, wurden die Linien stark geglättet. Das führt einerseits zu einer Vereinfachung und somit Übersichtlichkeit, andererseits zu einer Verfälschung. Da das Ziel die Rekonstruktion des Gesamthirns war und die Erkenntnis, in welche Neuropile die PDF-Neuriten projizieren, und nicht die exakte Form der einzelnen Faser, wurde die Glättung favorisiert.



Eine weitere Problematik stellen Bereiche dar, in denen Fasern (bzw. Varikositäten) sich überkreuzen oder verzweigen. Der Unterschied der zwei Alternativen ist der Aufnahme, wenn es sich um dieselbe Ebene handelt, nicht zu entnehmen. Um die Lage der Fasern zueinander möglichst wenig zu verzerren, wurden Verzweigungen bevorzugt. Auch bei späterer Glättung verändern solche „Branchpoints“ ihre Position nur geringfügig, während sich „freie“ Kurven stark dem geraden Verlauf anpassen.

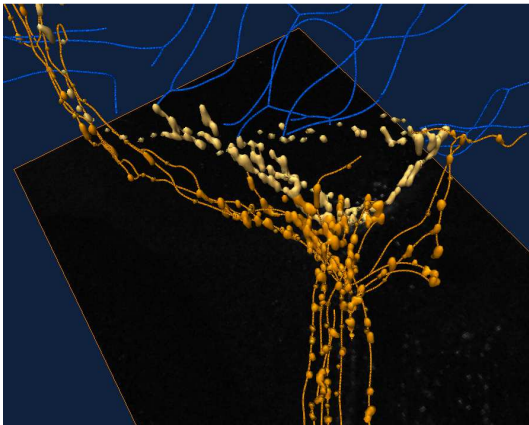


Abb. 2.12: Varianten der Neuritenrekonstruktion: blau: Medullafasern im Zeichenmodus, beige: „Loop“ über „ComputeSurface“, orange: posteriore optische Kommissur als Kombination beider Varianten.

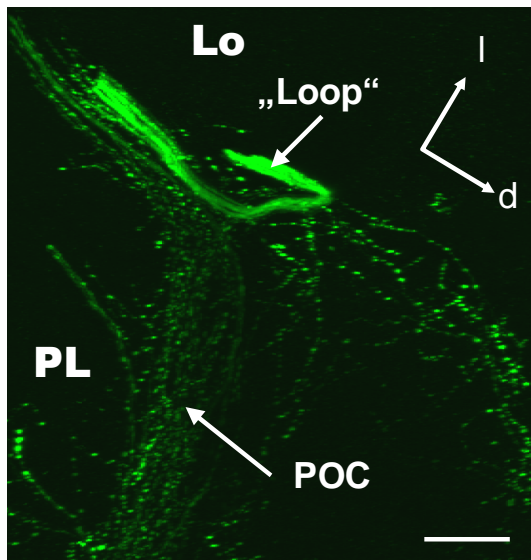


Abb. 2.13: Projektion eines Teils des „Loops“. Der „Loop“ besteht aus mehreren Fasern. Abk.: Lo = Lobula; PL = Protocerebrallappen; POC = posteriore optische Kommissur. Sammelbiene zu CT22. Messbalken = 50 µm.

Einige Fasern sind deutlich breiter gefärbt als andere. Die Dicke der Zellfortsätze kann zwar über das „fit segment diameter“-Werkzeug berechnet und dargestellt werden, doch zeigte ein Versuch, dass die Visualisierung nicht mit der Vorlage übereinstimmte. Die Varikositäten müssten deutlich dicker generiert werden als die Verbindungen dazwischen, was nicht der Fall war (Abb. 2.11, C). Auch bei dickeren Fasern zeichnete das Programm diese nicht automatisch breiter (vgl. „Loop“ als beige Rekonstruktion in Abb. 2.12 und als Projektionsdarstellung einer anderen Biene in Abb. 2.13). Im Allgemeinen rekonstruiert der Befehl „ComputeSurface“ die nachgezeichneten Nervenfasern zu wirklichkeitsnahen Strukturen. Bei einer solchen Oberflächenberechnung wird der Durchmesser der Fasern mitberücksichtigt. Jedoch resultieren bei dem Verfahren realerweise wieder Varikositäten (Abb. 2.12), wobei schwach gefärbte und kleine verloren gehen und eng nebeneinander liegende verschmelzen. Der Verlauf der Fasern wird dadurch unüberschaubar oder nicht erkennbar, weswegen beschlossen wurde, die Fasern im gezeichneten Modus, einheitlich im Durchmesser beizubehalten. Im Fall des „Loops“,

der vermutlich aus vielen Fasern besteht und daher dicker erscheint (siehe Projektionsabb. 2.13), wurden zahlreiche Fasern parallel gezeichnet (vgl. 0, S. 62).

### 2.7.3.4 Zusammensetzung aller rekonstruierten Strukturen

Sind die Neuropile, die PDF-Neurone und -Neuriten vollständig rekonstruiert, werden sie überlagert und zu einem kompletten Gehirn zusammengesetzt. Da das Bienenhirn aufgrund seiner Dicke von zwei Seiten – dorsal bis zur Mitte und ventral bis zur Mitte – gescannt wurde (2.1.3, S. 28 und 2.7.3 auf S. 50), mussten zuerst die beiden Hälften zu einer passenden Gesamtheit gebracht werden.

Die Amira®-Software bietet die Möglichkeit, Module dauerhaft zu verschmelzen (→ ▷ – *Compute* – **Merge**). Dadurch können die Rekonstruktionen direkt zusammenhängend erstellt werden. Leider kann der Computer die Datenmenge dieses Bienenhirns nicht mehr bearbeiten. Verschiedene Versuche, die Menge zu beschränken oder die Speicherkapazitäten anzupassen, reichten nicht aus. So wurde entschieden, das Gehirn in zwei Hälften zu belassen und manuell zusammenzubringen. Die Nachteile liegen darin, dass eine Kante zwischen den beiden Hälften sichtbar bleibt und der Verlauf von Fasern unterbrochen wird. Es wurde versucht, diese so gering wie möglich ausfallen zu lassen.

Das **manuelle Verschieben** eines Moduls beim Zusammenfügen der beiden Rekonstruktionshälften erwies sich vor allem wegen der Feinjustierung des Rotationswinkels sowie der unterschiedlichen x- und y-Lagen als zu unpräzise. Eine pixelgenaue Ausrichtung lässt sich rechnerisch mithilfe der Computersoftware über „**Landmarks**“ realisieren. Zuerst wird jeweils eine Ebene (ein „slice“) im oberen wie auch im unteren Bildstapel ausgesucht, deren Neuritenmuster möglichst identisch ist (hier im oberen Modul „slice“ 78, im unteren „slice“ 2). Da die Module der zwei Hälften auf den gleichen Grundkoordinaten im „Viewer“ liegen, müssen die gewählten „slices“ zunächst auf die gleiche z-Ebene gebracht werden. Zu diesem Zweck verschiebt man einen Bildstapel um die Anzahl an Ebenen in der z-Achse, die sich zwischen den ausgewählten Schnitten befindet. Da hier 1 Voxel einer z-Tiefe von 2,78 entspricht, muss ein Modul bei 76 Schichten um -211,28 versetzt werden; das Minuszeichen gibt die Richtung an.

Im „Landmark“-Modul (→ *Create* – *Data* – *Landmarks (2 sets)*) werden nun in den zwei Schichten identische Strukturen oder Fasermuster gesucht. Immer direkt aufeinanderfolgend – und damit für den Computer als zusammenpassend definiert – klickt man solche analogen Punkte in den zwei „slices“ an, die die Software anschließend in Deckung bringen soll (Abb. 2.14, S. 58). Im „Landmark“-Modul legt ein „LandmarkWarp“ die gewählten zusammengehörenden Punkte aufeinander (→ ▷ *Compute* – *LandmarkWarp*). Hierbei wurde als Methode eine „Rigid Transformation“ ausgewählt, die beim Überlappen eines der beiden Bilder um den nötigen Winkel in der xy-Ausrichtung dreht, die Punkte in ihrer Lage zueinander aber nicht deformiert (vgl. Abb. 2.15 und Abb. 2.16).

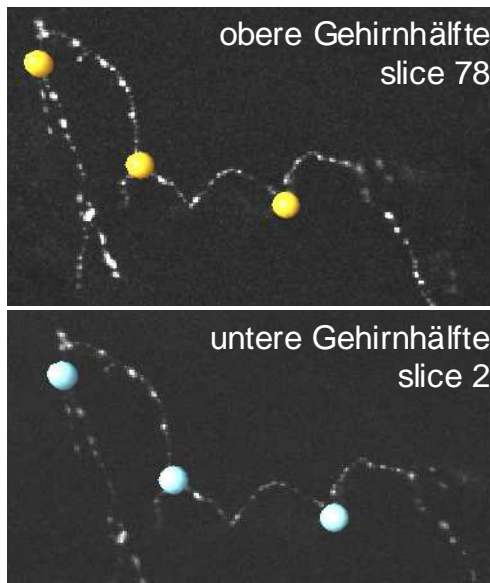


Abb. 2.14: LandmarkView.

Der zweigeteilte „Viewer“ (links) zeigt jeweils den stark vergrößerten Ausschnitt mit dem markanten Neuritenmuster im Antennallobus, links oben den „slice“ 78 der oberen und darunter den „slice“ 2 der unteren Gehirnhälfte. Der „Pool“ (rechts) zeigt die nötige Module-Struktur.

In den jeweiligen „LandmarkViews“ (hier „Landmark

View3“ mit der oberen Gehirnhälfte und „LandmarkView4“ mit der unteren Gehirnhälfte) werden identische Merkmale mit dem Computercurser angeklickt; obligatorisch gehören der erste (gelber Punkt im „Viewer“) und der zweite Mausklick (blauer Punkt) zusammen. Idealerweise sollten so viele passende Merkmale wie möglich markiert werden, um eine genaue Transformation zu erhalten. Die Landmark-Punkte sind in diesem Beispiel für die Abbildung größer dargestellt, in Wirklichkeit wurden sie in der Größe eines Pixels eingestellt und waren damit für eine exakte Auswahl im mikroskopischen Bild geeignet.

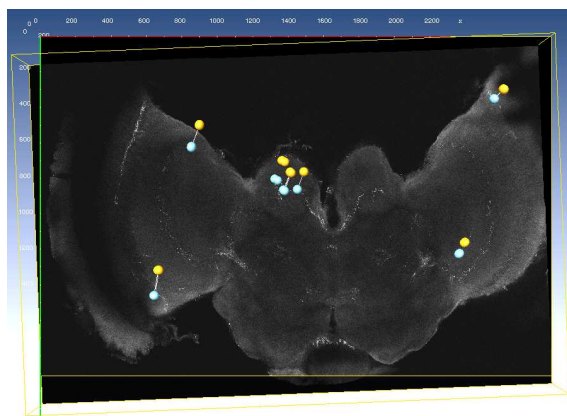
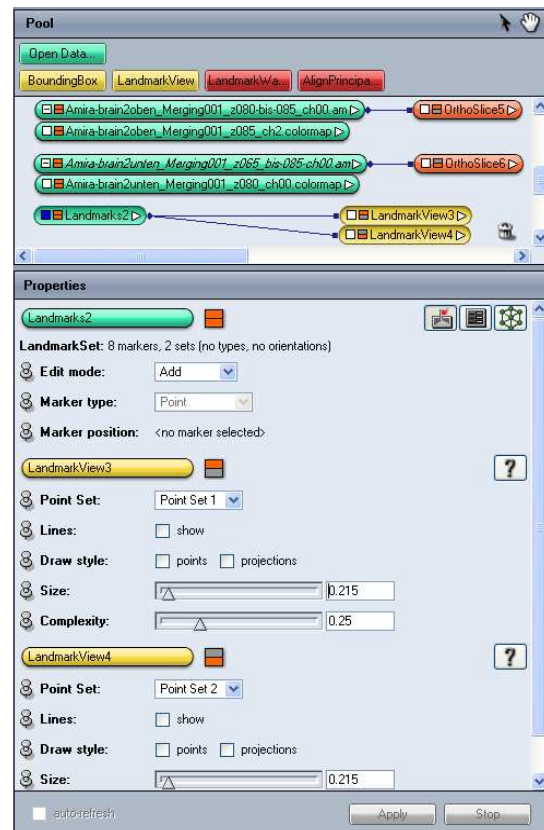


Abb. 2.15: Die „Rigid Transformation“ ist durch Linien zwischen den zusammengehörenden Punkten dargestellt. Sie zeigt die Verschiebung und die Rotation eines Bildstapels an.

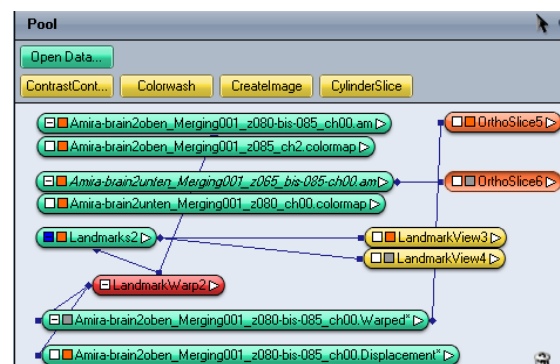


Abb. 2.16: Die „Pool“-Struktur bei der „Landmark“-Methode.

Der Versuch, beide Bildstapel komplett mit allen Ebenen über die „Landmark“-Methode zu positionieren, scheiterte an der nötigen Speicherkapazität. Über das beschriebene Verfahren konnten aber der Winkel und alle Transformationswerte ermittelt werden, die für das Anpassen nötig waren. (Eine Transformation beruht auf insgesamt 16 Zahlen, die im „Parameter Editor“ abgerufen werden können.)

Für die Winkelbestimmung wurde über das „Warp“-Modul der originale, identische, nicht „gewarppte“ Bildstapel gelegt, der dann manuell mithilfe der „Dialog“-Box des „Transform Editors“ per Zahleneingabe verschoben und gedreht wurde, bis er deckungsgleich mit dem unter ihm liegenden Bezugsbild war. Ein transparent dargestelltes Modul erleichterte das Positionieren der beiden Module („Orthoslice“ auf „alpha“ gestellt, d. h. die dunklen Bereiche werden durchsichtig, die gefärbten Neuriten bleiben leuchtend weiß). Der so platzierte Bildstapel diente als Kopiervorlage für alle folgenden Transformationen.

Das Positionieren eines Moduls in seinen Koordinaten muss für jede einzelne Rekonstruktion separat durchgeführt werden. Die Transformationswerte des über „Landmarks“ verschobenen Moduls können in Amira® kopiert werden und auf jeden weiteren Datensatz, der ausgerichtet werden soll, übertragen werden (→ „Transform Editor“ des positionierten Moduls – Action: copy – „Transform Editor“ des zu positionierenden Moduls – Action: paste).

Leider überschritt die Größe des „Transformationsmoduls“, eingefügt als Kopiervorlage in andere „Networks“, wieder einmal die Speicherkapazität. Ein „Crop“ des wichtigen Moduls auf nur eine Ebene, nämlich die mit dem unteren Bildstapel übereinstimmende Schicht („slice“ 78), verkleinerte es ausreichend. So konnte es letztendlich als Kopiervorlage dienen. Die Schrift eines in seinen Koordinaten modifizierten Moduls wechselt im „Pool“ auf kursiv und informiert somit dauerhaft über die Positionsänderung.

Für die Darstellung der Neuropile, der Neurone und der Neuriten in einem Bild zusammen werden alle relevanten Rekonstruktionen als „surf“-Module geladen und entsprechend positioniert. Durch Aktivieren oder Deaktivieren können nun beliebige Konstellationen in dem Bienenhirn betrachtet werden. Um den Verlauf der Fasern in einem Neuropil sehen zu können, muss dieses „transparent“ gestaltet werden („→ Draw Style – transparent“ im „Properties“-Fenster bei aktiviertem „SurfaceView“).

Jede Rekonstruktion wird dreidimensional visualisiert (Kapitel 3.3). In den Snapshots gibt es daher einen Fluchtpunkt, weswegen weiter hinten liegende Bereiche kleiner erscheinen als weiter vorne liegende. Ein Skalierungsbalken dient einer ungefähren Größenabschätzung im Fokus der Abbildungen; er kann aufgrund des Fluchtpunktes keinen absoluten Wert für die gesamte Zeichnung wiedergeben. Am Bildrand helfen drei farbige Axen bei der räumlichen Orientierung: anterior (a) und posterior (p) in Blau, ventral (v) und dorsal (d) in Grün sowie rechts und links lateral in Rot (Beispiel Abb. 3.10, S. 82).

### 2.7.3.5 Rekonstruktions-Beispiele

Folgende Gegenüberstellungen illustrieren die Originalaufnahmen unter dem CLSM und die entsprechenden Rekonstruktionen mit Amira®. Links sind immer die mikroskopischen Originalbilder und rechts die Rekonstruktionen, hinterlegt mit dem Originalscan, dokumentiert. Zwei untereinander gezeigte Aufnahmen präsentieren den gleichen Ausschnitt im identischen Maßstab in unterschiedlicher Tiefe des exemplarischen Honigbienengehirns.

#### 2.7.3.5.1 Die PDF-Neurone und ihre unmittelbaren Projektionen

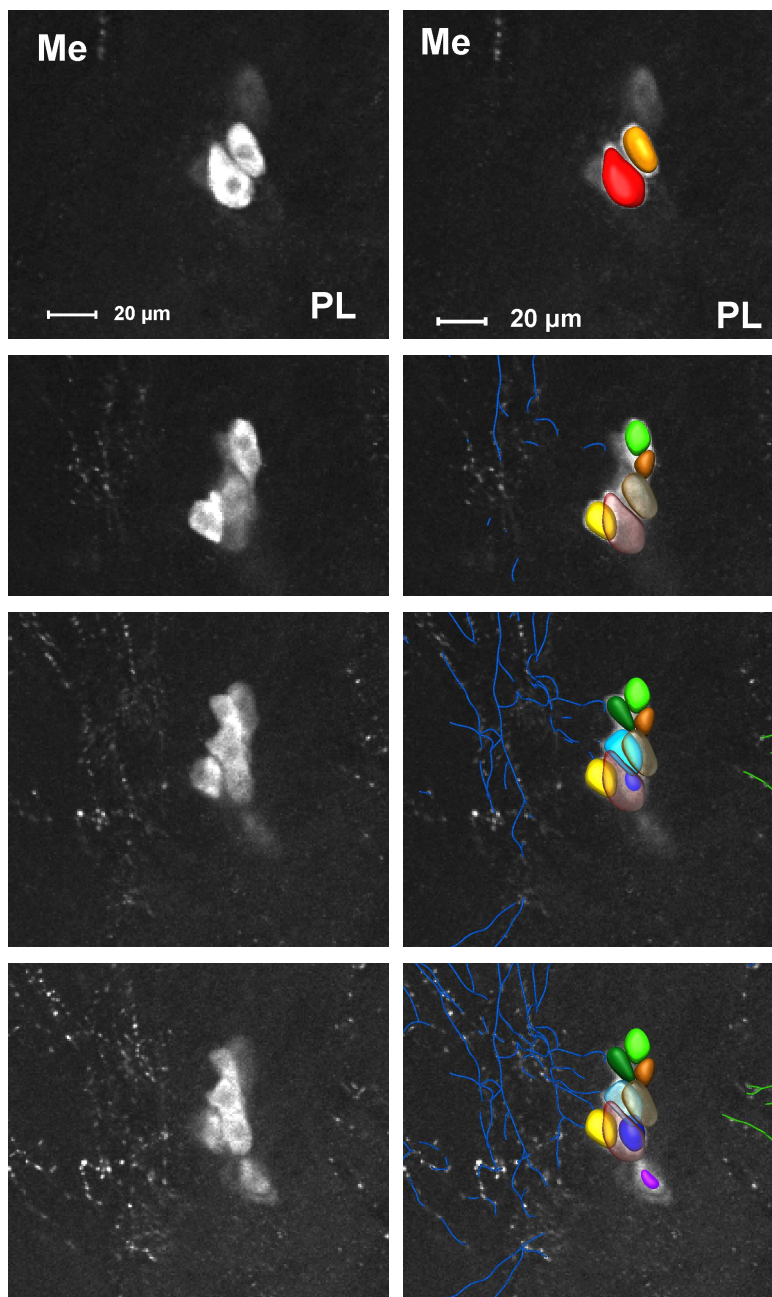


Abb. 2.17: Gegenüberstellung der CLSM-Originalaufnahmen (links) mit der Amira®-Rekonstruktion (rechts) der PDF-Somata (linke Hemisphäre). Me/PL zeigen die Lage der Medulla/ des Protocerebrallappens. Vorne ist anterior, in der Tiefe posterior.

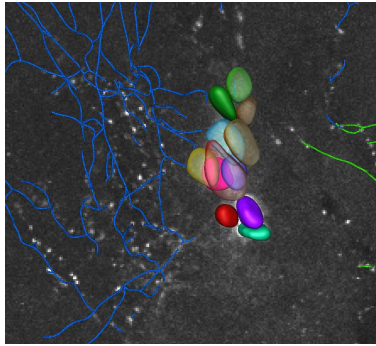
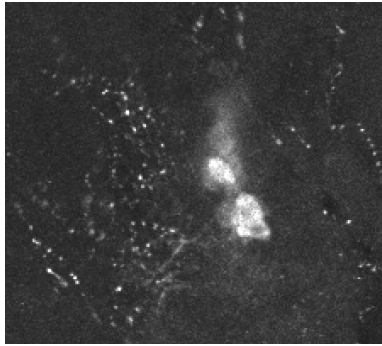
**A:** Slice 41 – In ca. 110 µm Tiefe liegen die ersten Zellen, die in Bild B transparent dargestellt sind.

**B:** Slice 46 – Ca. 15 µm tiefer erscheinen drei weitere Somata. Bei der grünen und braunen Zelle könnte es sich auch um eine Zelle handeln. Ein Vergleich mit Bild C zeigt: entweder die Färbung im Zytoplasma ist ungleichmäßig oder es sind zwei Zellkerne und damit zwei Zellen.

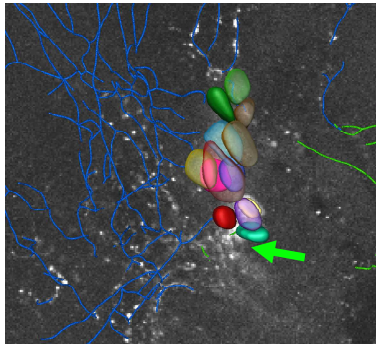
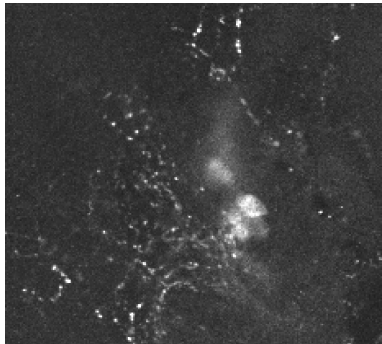
**C:** Slice 51 – Etwa 15 µm weiter posterior tauchen die nächsten Zellen auf. Die ersten Fasern nähern sich bildlich betrachtet den Zellen. Nur einige Fasern kann die Software definitiv verfolgen.

**D:** Slice 54 – Die Rekonstruktion des Faserverlaufs ist aufgrund der punktförmigen Färbung sehr interpretationsabhängig. Diese CLSM-Aufnahme befindet sich etwa 8 µm weiter posterior als Bild C.

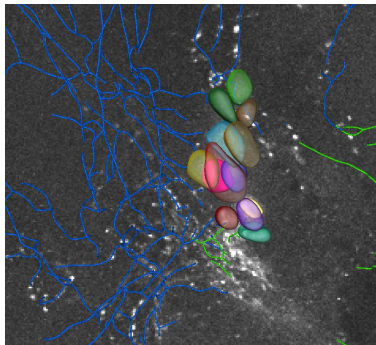
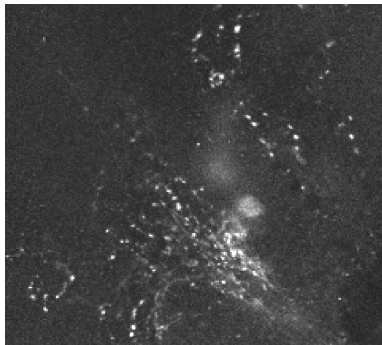




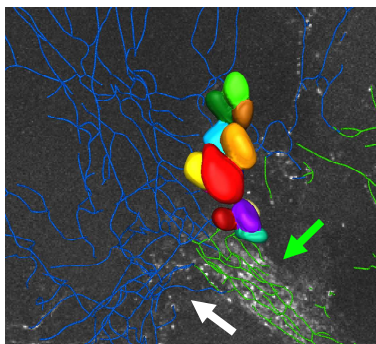
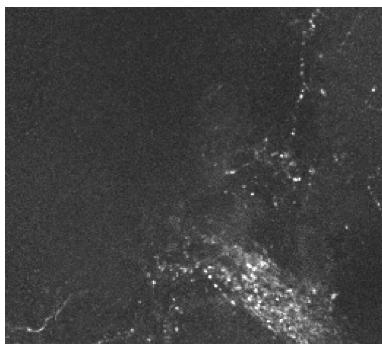
**E:** Slice 59 – Es ist kaum möglich, alle Varikositäten differenziert zu verfolgen und als zusammenhängende Neuriten zu erfassen.



**F:** Slice 62 – Vermutlich von den dorsalen Zellen (die im Bild oben befindlichen) ziehen die Neuriten zur Medulla, von den ventral liegenden eher in Richtung Protocerebrallappen (grüner Pfeil, vgl. auch mit Folgebild G).



**G:** Slice 65 – Die varikosen Neuriten aus den ventralen Zellen (vgl. Bild F) ziehen als breiteres Bündel in Richtung Protocerebrallappen (Lagebeziehung siehe Bild A).



**H:** Slice 73 – Das in Bild G erwähnte Faserbündel erstreckt sich in den Protocerebrallappen (grüner Pfeil). Vermutlich gegenläufig von kontralateral kommend (vgl. Diskussion 4.3) ziehen aus dem gleichen Trakt Fasern in die Medulla (weißer Pfeil).

### 2.7.3.5.2 Ein Ausschnitt mit der POC und dem „Loop“

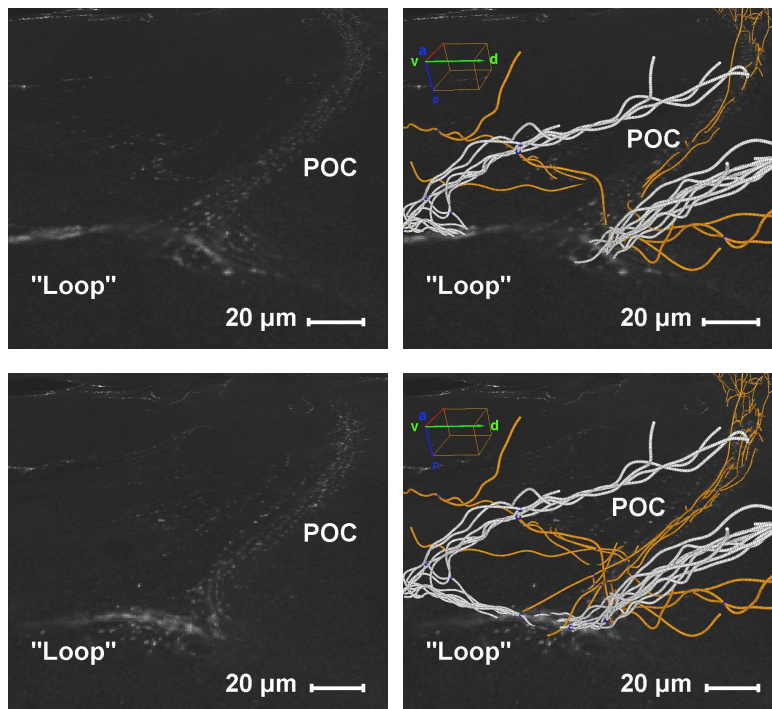


Abb. 2.18: Gegenüberstellung der CLSM-Originalaufnahmen (links) mit der Amira®-Rekonstruktion (rechts) der POC und des „Loop“.

**Oben:** Slice 51 – Die varikosen Fasern der „posterior optic commissure“ (POC) verlaufen eindeutig in lateraler Ausrichtung. Das Verfolgen einer einzelnen Faser ist über einen längeren Abschnitt durch die ganze Kommissur leider nicht realisierbar. Daher setzt sich die visualisierte POC teilweise aus Fragmenten zusammen. Der „Loop“ ist prägnanter gefärbt und wurde als Bündel vieler Fasern rekonstruiert (vgl. Abb. 2.13, S. 56 und Erklärung auf S. 94).

**Unten:** Slice 56 – Die POC läuft auf der dorsalen Seite parallel neben dem „Loop“, zieht aber auch „mittig“ gerade auf die „Schleife“ zu.

### 2.7.3.5.3 Ein Ausschnitt aus dem anterioren Protocerebrum

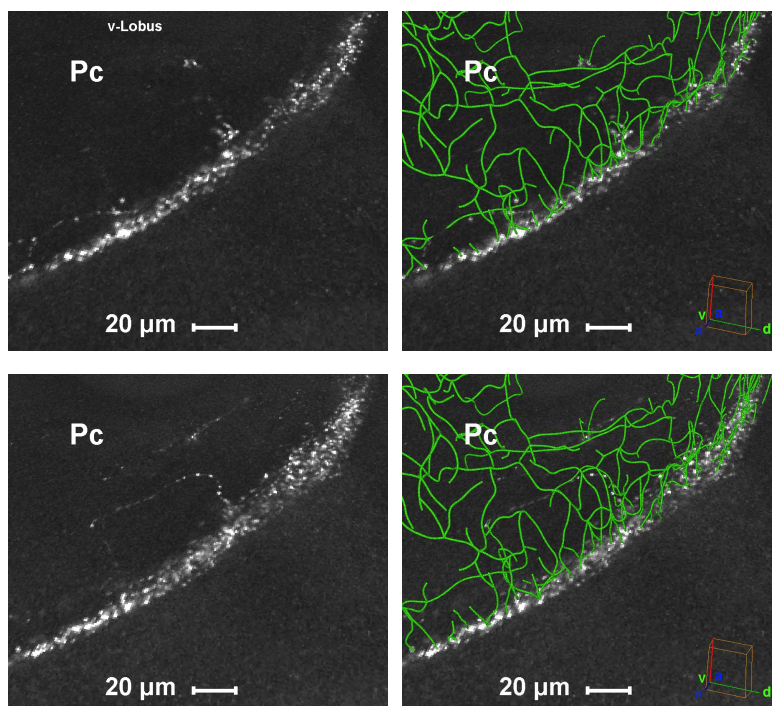


Abb. 2.19: Gegenüberstellung der CLSM-Originalaufnahmen (links) mit der Amira®-Rekonstruktion (rechts) des dorsolateralen Protocerebrallappens am Rand des Neuropils.

**A:** Slice 28 – Die Varikositäten am protocerebralen, dorsolateralen Rand können nur vereinzelt eindeutig verbunden werden.

**B:** Slice 32 – Die Fasern sind wahrscheinlich senkrecht zur Aufnahmeebene ausgerichtet, da sich die Varikositäten in der z-Achse (Tiefe) von der Software verbinden und rekonstruieren lassen, dagegen nicht parallel der gezeigten Ebene.

## 2.8 Verwendete Materialien und Geräte

Im Folgenden sind die Lösungen, Reagenzien, Geräte, Futter- und sonstige Mittel inklusive Herstellung und Bezugsquelle aufgeführt, die für die Durchführung der Experimente und deren Ausarbeitung benötigt wurden.

Tab. 2.9: Verwendete Materialien und Geräte

<b>Lösungen / Reagenzien / sonstige Medien</b>		
<b>Gelatine-Albumin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 12 g Gelatine (Sigma, 300 Bloom)</li> <li>• 75 g Ovalbumin (Sigma, A 5253, Albumin Chicken Egg, Grade III)</li> <li>• 250 ml Aqua dest.</li> </ul>	Sigma
<b>Methylbenzoat</b>	Synonym Benzoessäuremethylester	Merck
<b>Paraformaldehyd</b>	4 % Paraformaldehyd (PFA)	Helfrich-Förster (2007b)
<b>Permunt</b>	Einbettmedium für Dauerpräparate	Fisher Scientific
<b>Phosphatpuffer (PB)</b>	0,1 M, pH 7,4	Merck; Helfrich-Förster (2007b)
<b>PB mit TrX (PBT)</b>	0,1 M PB mit 0,5 % Triton X-100	
<b>Vectashield</b>	Einbettmedium f. Fluoreszenzpräparate	LINARIS
<b>Zamboni's Fixativ</b>	Fixiermittel für viele Peptidantiseren in z. B. Vibratomschnitten, Wholemounts <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 % Paraformaldehyd</li> <li>• 7,5 % gesättigte Pikrinsäurelösung</li> <li>• in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4</li> </ul>	Zamboni and DeMartino (1976)
<b>Primäre Antikörper</b>		
<b>anti-Apis-CRY</b>	Human & ApisCry-m; by Design, monoklonal, Fab	Labor Guy Bloch, Hebron Universität Jerusalem (Israel)
<b>anti-Apis-PER</b>	Sheep & ApisPer; Peptid AK	
<b>anti-Apis-TIM</b>	Rabbit & ApisTim2; polyklonal	
<b>anti-PDH</b>	Rabbit anti-beta PDH	Dirksen et al. (1987)
<b>anti-Synapsin</b>	nc82, Mouse anti-Synapsin, monoklonal	MAB Hofbauerlibrary
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
<b>Alexa Fluor 488</b>	Goat anti-Rabbit Amax. = 495 nm / Emax. = 519 nm	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 555</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Goat anti-Rabbit</li> <li>• Goat anti-Mouse</li> </ul> jeweils Amax. = 555 nm / Emax. = 565 nm	
<b>Alexa Fluor 647</b>	Goat anti-Rabbit Amax. = 650 nm / Emax. = 665 nm	
<b>CyTM 3</b>	Goat anti-Human Amax. = 550 nm / Emax. = 570 nm	Jackson ImmunoResearch (Code 109-166-097)
<b>DyLightTM 488</b>	Donkey anti-Sheep Amax. = 493 nm / Emax. = 518 nm	Jackson ImmunoResearch (Code 713-485-147)
<b>Weitere Färbemittel / Seren</b>		
<b>Lucifer Yellow CH dilithium salt</b>	Excitation = 425–430 nm Emission = 515–520 nm	Sigma (Product Number L0259)
<b>Normal Donkey Serum (NDS)</b>	4 % NDS in PBT	Sigma-Aldrich
<b>Normal Goat Serum (NGS)</b>	4 % NGS in PBT	



<b>Geräte / Mikroskope</b>		
<b>Bienensauger</b>	Umgebauter Handstaubsauger	No-Name-Produkt; Arbeitsgruppe Stroh, Universität Regensburg
<b>Inkubator</b>	Typ B 6030; (Best. Nr. 51000306), Nenntemp. 50°C, Einstellung: 28°C	Heraeus instruments
<b>Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM, Zeiss)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LSM 510 Meta</li> <li>• Programm: LSM Image Browser, Release 4.2 (Freeware)</li> <li>• Objektive: 10 x und 100 x</li> </ul>	Carl Zeiss AG Jena
<b>Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM, Leica)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laser-Rastermikroskop, Typ DM 5500 Q, Microsystems LAS AF – TCS SPE</li> <li>• Programm: LAS AF Lite, Version 2.2.1 build 4842</li> <li>• Objektiv: ACS APO 10.0 x 0.30 DRY</li> </ul>	Leica Microsystems CMS GmbH
<b>Lampe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intralux 6000-1: 230V/50/60HZ Einstellungen: Intensity high/Stärke 1,80</li> <li>• Glühbirne Halogen Display/Optic Lamp, EKE 150 W-21 V-GX 5.3, NAED 54842 (&gt;500°C)</li> </ul>	Intralux  Osram
<b>Ventilator</b>	12 V-Ventilator ca. 10 x 10 cm Einstellung: Max. 12 V	No-name
<b>Vibrator</b>	Modell VT1000 S Einstellungen: Speed 8; Frequenz 5	Leica
<b>Computerprogramme</b>		
<b>Amira®</b>	Version 4.1.1.	Mercury Computer Systems
<b>Image J</b>	Version 1.40g (Freeware)	Wayne Rasband, <a href="http://www.rsb.info.nih.gov/ij">www.rsb.info.nih.gov/ij</a>
<b>Microsoft® Office Excel</b>	Version 2003	Microsoft®
<b>SYSTAT (ANOVA)</b>	Version 11	Systat Software GmbH
<b>Sonstiges / Futtermittel</b>		
<b>Deckgläser</b>	24 x 32, 24 x 40 und 22 x 22 mm Standardstärke # 1 (0,13 – 0,16 mm)	Menzel
<b>DePeX</b>	zum Festkleben der Abstandshalter auf Deckgläschen (Ganzhirne)	SERVA
<b>Fixogum</b>	Verwendet als Abdichtmasse	Marabu
<b>Heftklammern</b>	Größe 24/6 nach DIN 7405, verzinkt, verwendet als Abstandshalter	NOVUS
<b>Mikrotiterplatte</b>	Standardplatte 8 x 12 Vertiefungen mit F-Boden (Flachboden)	Nunc
<b>Objektträger</b>	24 x 60 mm Superfrost (Zur leichteren Ausrichtung der Schnitte mit mit Chromalaun beschichten.)	Menzel
<b>Parafilm</b>	Abdichtfolie	Pechiney Plastic Packaging
<b>Zuckerwasser (Futter)</b>	Zucker gelöst in abgek. Wasser (1:1)	Südzucker

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 PDF-Oszillationen im Gehirn der Honigbiene

##### 3.1.1 Vergleich von Sammel- und Stockbienen unter LD

###### 3.1.1.1 Versuchsreihe mit vier Zeitpunkten (1. Exp.)

Im ersten Experiment wurden die Gehirne von Sammel- und Stockbienen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Zeitgeber Time ZT4, 10, 16 und 22) unter LD 12:12 auf die Intensität ihrer PDF-immunreaktiven Färbung hin quantifiziert. In der Abb. 3.1 auf S. 66 sind die Ergebnisse grafisch zusammengefasst: die linke Spalte enthält die Diagramme, die die Sammelbienen („*foragers*“) betreffen, die rechte stellt die der Stockbienen („*nurses*“) vor. Die Anordnung der Grafiken von oben nach unten ist immer gleich, zuerst kommt das Diagramm mit der Anzahl der Zellen („*number of cells*“), dann folgen die Diagramme mit der PDF-Färbeintensität („*staining intensity*“) des Zytoplasmas der PDF-Neurone („*cells*“) und zuletzt mit der PDF-Färbeintensität der PDF-Neuriten („*fibers*“). In den Schaubildern, die die Anzahl und die Färbeintensität der PDF-Somata betreffen, ist der zeitliche Verlauf der Oszillationen getrennt in die linke (blau dargestellt) und rechte Gehirnhälfte (grün) aufgetragen sowie der Mittelwert für beide Hemisphären (rot). Ein Vergleich der Kurven zeigt keine auffälligen Unterschiede, weswegen in vielen Abbildungen allein der Mittelwert beider Hemisphären wiedergegeben ist. Die Grafiken zu den Färbeintensitäten der PDF-Neuriten („*fibers*“) beschränken sich aufgrund der geschilderten minimalen Abweichungen ausschließlich auf den Mittelwert beider Hemisphären. Jedem Faserbereich (vgl. Abb. 2.5 und Tab. 2.8 auf S. 46) ist eine eigene Farbe zugeordnet. Ein am oberen Bildrand parallel zur Zeitachse verlaufender, weiß-schwarzer Balken symbolisiert den Hell-Dunkel-Wechsel und bezieht sich auf alle darunter aufgeführten Diagramme.

Bei den **Sammelbienen** (Abb. 3.1, linke Spalte, „*foragers*“) verändert sich die Anzahl der PDF-Zellen (oberste Grafik) im zeitlichen Verlauf leicht und kontinuierlich. Die niedrigste Zellzahl verzeichnet man zu ZT4 mit 26, die höchste zu ZT16 mit insgesamt 30 PDF-Somata. Jeweils ein Zeitpunkt vor und hinter dem Scheitel wurden im Schnitt 28 PDF-Perikaryen ermittelt. (Es handelt sich durchwegs um gerundete Zahlen. Beispielsweise verbirgt sich in der linken oberen Grafik der Abb. 3.1 hinter dem Höchstwert von 30 Zellen die Kommazahl 29,5, weswegen der Datenpunkt in dem Diagramm nicht direkt auf der Linie, sondern leicht nach unten versetzt liegt.)

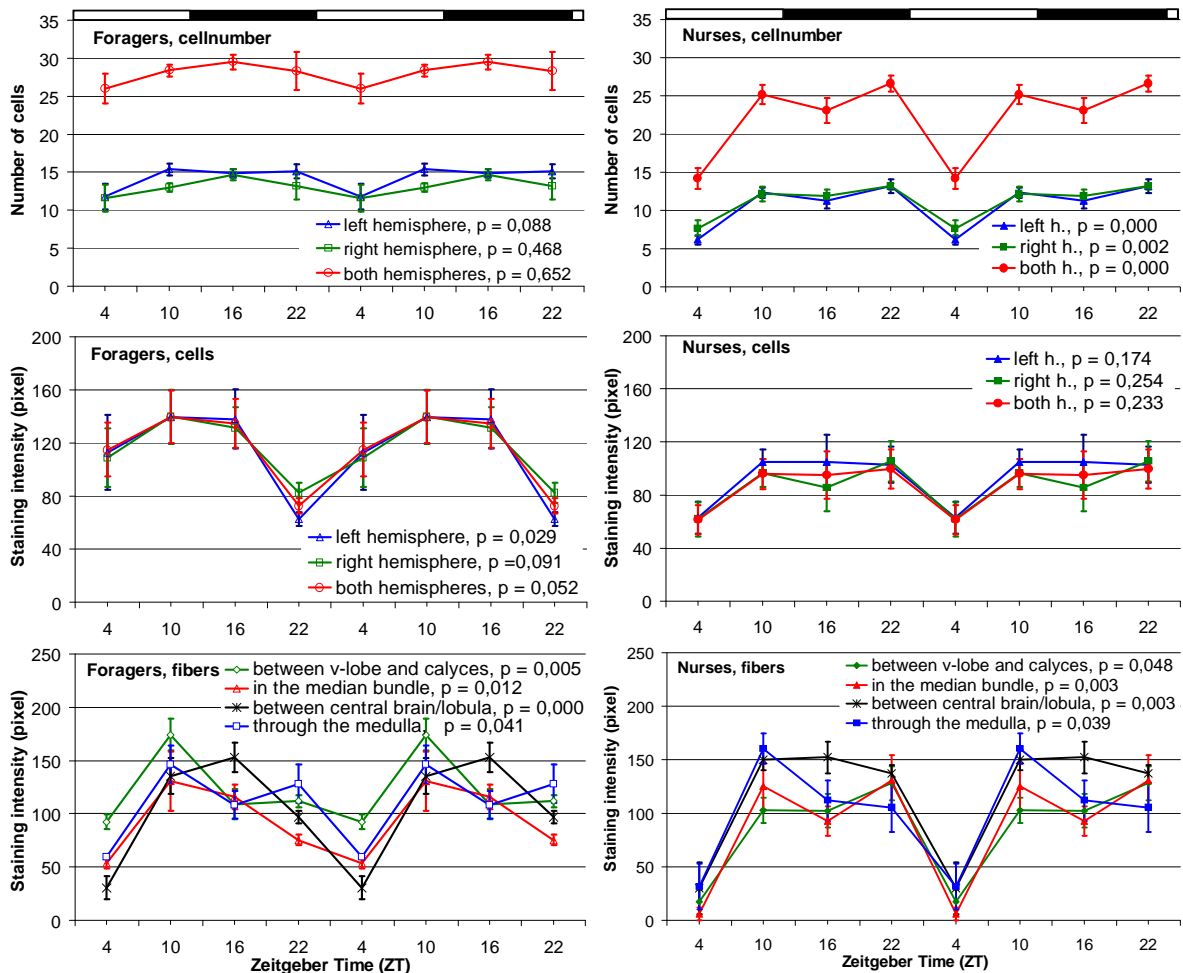


Abb. 3.1: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen anhand von vier Zeitgeber-Zeiten. Alle Grafiken der linken Spalte betreffen Sammel- („foragers“), die der rechten Spalte Stockbienen („nurses“). Untereinander platziert sind, von oben nach unten folgend, die Anzahl der PDF-Zellen („cellnumber“), die Färbeintensität („staining intensity“) des Zytoplasmas der PDF-Neurone („cells“) sowie deren Fasern („fibers“), aufgetragen gegen die Zeitgeber-Zeit (ZT) unter LD 12:12. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“). Eine detaillierte Beschreibung der Kurvenverläufe befindet sich im Text.

Die PDF-immunreaktive Färbung im Zytoplasma der PDF-Neurone (linke, mittlere Grafik) ist bei den Sammelbienen zu ZT22, d. h. zwei Stunden vor Licht-an, am schwächsten und zu ZT10, zwei Stunden vor Licht-aus, am stärksten. Dabei ist der Maximumwert mit  $140 \pm 20$  Pixeln etwa doppelt so hoch wie der Minimumwert mit  $73 \pm 6$  Pixeln. Die Datenpunkte zeitlich vor und hinter dem Maximum sind ebenfalls relativ hoch mit  $115 \pm 20$  und  $135 \pm 18$  Pixeln, der obere Scheitel verläuft daher eher flach. Zwischen ZT16 und 22 fällt der Graf steil zum Minimum ab. Der Kurvenverlauf für beide Hemisphären verpasst die Signifikanz mit einem p-Wert von 0,052 nur knapp (die p-Werte sind in der Grafik integriert).

Die zeitlichen Verläufe der PDF-Färbeintensitäten in den Neuriten des Sammelbienen-gehirns (linke, untere Grafik) haben in allen ausgewerteten Faserbereichen einen gemeinsamen Tiefpunkt bei ZT4. Danach steigen alle Kurven steil zum Höchstwert bei ZT10 an, mit Ausnahme der Fasern zwischen Zentralgehirn und Lobula, die ihre maximale Färbe-

intensität erst bei ZT16 erreichen. Anschließend fallen die Werte allmählich bis zum bereits erwähnten Minimum ab. Alle Neuriten-Kurvenverläufe weisen eine Signifikanz auf. Sämtliche Daten zu den Sammelbienen basieren auf jeweils zwei bis vier Individuen (Ausnahme bei ZT22 mit sieben Proben).

Den Daten zu den **Stockbienen**-Grafiken (Abb. 3.1, rechte Spalte, „nurses“) liegen fünf bis acht Individuen pro Zeitpunkt zugrunde.

In den Stockbiergehirnen existiert die niedrigste Anzahl an PDF-Zellen (rechte Spalte, obere Grafik) bei ZT4 mit 14, die höchste bei ZT22 mit 27 Somata (gerundet aus dem Originalwert 26,6). Zu ZT10 und 16 wurden im Mittel 25 und 23 Neurone ausgezählt. Die Differenz zwischen Tiefst- und Höchstwert beträgt 13 Zellen, unter Beachtung des ungerundeten Gesamtwertes können 6 Zellen pro Hemisphäre angenommen werden. Die Kurvenverläufe zur Zellanzahl sind bei den Stockbienen signifikant.

Das Zytoplasma in den PDF-Somata der Stockbienen (rechte, mittlere Grafik) zeigt zum Zeitpunkt ZT4 die geringste PDF-Konzentration (gemittelt  $61 \pm 11$  Pixel). Zwischen den wiederkehrenden Tiefstwerten bewegt sich die Neurotransmittermenge in etwa auf einem Niveau von 95 Pixeln. Die Differenz zwischen Höchstwerten und Tiefstwert beträgt bei den Stockbienen ca. 35 Pixel.

Die immunreaktive PDF-Färbung in den untersuchten Neuriten der Stockbienen (rechte, untere Grafik) weist in allen Bereichen (vgl. Abb. 2.5 und Tab. 2.8, S. 46) bei ZT4 ihr Minimum auf. Für die Neuriten im „*median bundle*“ zeigen sich zwei hohe Werte bei ZT10 ( $125 \pm 21$  Pixel) und ZT22 ( $131 \pm 23$  Pixel), für die Fasern zwischen v-Lobus und Calyces dagegen ein Höchstwert ( $128 \pm 16$  Pixel) bei ZT22. Indessen befindet sich das Intensitäts-Maximum der gefärbten Fasern zwischen Zentralgehirn und Lobula bei ZT10 und ZT16 ( $150 \pm 9$ ,  $152 \pm 15$  Pixel) sowie der Fasern, die durch die Medulla ziehen bei ZT10 ( $160 \pm 14$  Pixel). Der Unterschied zwischen dem Tiefstwert bei ZT4 und den jeweiligen Höchstwerten umfasst ungefähr 110 bis 130 Pixel. Alle Verläufe sind signifikant.

### 3.1.1.2 Versuchsreihe mit sechs Zeitpunkten (2. Exp.)

Das zweite Experiment erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie das vorangegangene, wobei die Anzahl der zu untersuchenden Zeitpunkte auf sechs erhöht wurde (ZT2, 6, 10, 14, 18 und 22).

In der Abb. 3.2 auf S. 70 sind wie in Abb. 3.1 in der linken Spalte die Sammel- und in der rechten die Stockbienen, von oben nach unten in der bekannten Reihenfolge aufgeführt.

In den Gehirnen der **Sammlerinnen** schwankt die Anzahl der PDF-Zellen in Abhängigkeit der Zeit zwischen 23 und 30 (Abb. 3.2, linke Spalte, obere Grafik). Zwischen der linken

und rechten Hemisphäre kann kein Unterschied festgestellt werden. Der Kurvenverlauf, berechnet für beide Hemisphären, ist signifikant ( $p = 0,038$ ). Er zeigt zwei Gipfel mit 28 Somata zu ZT6 und 30 zu ZT18. Dazwischen liegen zwei Täler mit 23 Somata bei ZT2 und 24 bei ZT14.

Die Analyse der PDF-Färbeintensitäten des Zytoplasmas der Neurone im Sammelbienenhirn (linke Spalte, zweite Grafik von oben) zeigt einen prägnanten Peak bei ZT22 mit 172 Pixeln für beide Hemisphären, jedoch mit einem immensen Fehlerbalken ( $\pm 45$  Pixel). Ein Zeitpunkt vor und nach dem Maximalwert steigt bzw. fällt die Kurve steil an bzw. ab. Zu den übrigen Zeitpunkten bleiben die Datenpunkte etwa auf einem Niveau von 80 Pixeln, jedoch mit der Tendenz, einen weiteren, kleineren Peak bei ZT6 mit ungefähr 100 Pixeln zu formen. Die Kurven erweisen sich als nicht signifikant, wobei die Signifikanz für beide Gehirnhälften nur knapp verfehlt wird ( $p = 0,052$ ).

Die übliche Vermessung der PDF-Fasern im Gehirn der Sammelbienen (linke Spalte, dritte Grafik von oben) ergab für alle ausgewählten Bereiche sättigende Intensitätswerte von 255 Pixeln. Je nach Hintergrundfärbung reduzierte sich dieser Wert. Als signifikant stellte sich trotz der Sättigung der zweigipfelige Verlauf der zeitabhängigen PDF-Intensitäten des Faserbereichs zwischen Zentralkörper und Lobula („*between central brain and lobula*“,  $p = 0,037$ ) heraus. Die Gipfelplateaus befinden sich bei ZT6 bis ZT10 und bei ZT18 bis ZT22. Aufgrund der Ungewissheit über die Richtigkeit der Daten (vgl. Kapitel 2.1.1, S. 26, „zweites Experiment“) können kaum Aussagen über die Verläufe gemacht werden. Einen Versuch, die Vorgehensweise bei der Bestimmung der PDF-Färbeintensität an die Umstände anzupassen, exemplifiziert die unterste Grafik in der linken Spalte, Messmethode „*squares 5x5 pixel*“. Ein Vergleich mit anderen Kurvenverläufen ist aufgrund der abweichenden Messmethode nur sehr eingeschränkt möglich. Signifikant und in seinem Verlauf ähnlich ( $p = 0,008$ ) bleibt nach dem Wechsel der Methode der Faserbereich, der sich zwischen dem Zentralkörper und der Lobula befindet. Als verändert stellt sich der Kurvenverlauf für die Fasern im „*median bundle*“ dar. Befand sich in der zuerst erhaltenen Grafik ein einzelner Peak bei ZT10, ergab die abgewandelte Untersuchung einen zweiten Gipfel bei ZT22. Im Bereich des zweiten Peaks erstreckte sich ursprünglich eine ausgedehnte Mulde, die von ZT14 bis ZT2 reichte. Bei den anderen Kurven (grün und blau) kann hauptsächlich ein nach unten korrigierter Verlauf und eine prägnantere Ausprägung der Extrempunkte beobachtet werden. Der Tiefstwert bei ZT14, der für alle untersuchten Faserbereiche – mit Ausnahme des „*median bundle*“ – besteht, bleibt auch in der Grafik mit der neuen Methode bestehen.

Die Individuenzahlen betragen bei den Sammlerinnen fünf bis sieben Tiere (Ausnahme bei ZT18 mit drei und bei ZT22 mit nur zwei Organismen).

Den **Stockbienen**-Grafiken liegen 5 bis 8 Individuen pro Zeitpunkt zugrunde (rechte Spalte in Abb. 3.2).

Bei der Betrachtung des „Zellanzahl“-Diagramms (rechte Spalte, obere Grafik) fällt zunächst ein eklatanter Einbruch auf nur 4 Somata bei ZT10 in beiden Hemisphären auf. Ein weiterer, kleinerer Einschnitt existiert bei ZT2 mit im Mittel 13 Perikaryen. Zwischen den zwei Tiefpunkten erhöht sich die Zellanzahl auf jeweils ähnliche Werte von 20 bzw. 21 Zellkörpern bei ZT6, gefolgt von 19 Somata bei ZT18 und ZT22. Alle p-Werte zu diesen Kurven ( $p = 0,000$  bis  $0,002$ ) belegen eine deutliche Signifikanz.

Den gleichen Einschnitt, den die, die Zellanzahl betreffende Grafik zeigt, offenbart das Diagramm, das die PDF-immunreaktive Färbeintensität des Zellzytoplasmas wiedergibt (rechte Spalte, zweite Grafik von oben). Der Mittelwert mit  $37 \pm 14$  Pixeln basiert bei diesem Zeitpunkt (ZT10) auf sechs Individuen, von denen in der linken Gehirnhälfte vier und in der rechten zwei keine PDF-Färbung erkennen ließen und somit mit „Null“ aufgenommen wurden. Während aller übrigen Zeitpunkte bewegen sich die Werte auf etwa einem Niveau zwischen 119 und 137 Pixeln (ZT22 und ZT6) mit einem Fehlerbereich von maximal  $\pm 22$  Pixeln. Alle Verläufe ergaben eine Signifikanz ( $p = 0,002$  bis  $0,030$ ).

Auch bei der Vermessung der PDF-Färbeintensitäten der PDF-Neuriten in den Gehirnen der Stockbienen (rechte Spalte, unterste Grafik) wiederholt sich das gleiche Bild: ein fast gegen Null fallender Wert bei ZT10, hier direkt im Anschluss an den Peak bei ZT6 mit Maximalwerten je nach Faserbereich von  $183 \pm 15$  bis  $205 \pm 4$  Pixeln im Mittel. Zu den übrigen Zeitpunkten ZT14 bis ZT2 verlaufen die Kurven zwischen 102 und 182 Pixeln, wobei man bei jedem Faserbereich einen weiteren, kleinen Peak feststellen kann. Die Fasern zwischen v-Lobus und Calyces, zwischen Zentralgehirn und Lobula sowie die Fasern, die durch die Medulla ziehen, zeigen einen zweiten PDF-Färbeintensitäts-Gipfel bei ZT18; die Fasern, die im „*median bundle*“ entlanglaufen, verzeichnen ihren bei ZT14. Auch bei den Neuritengrafen werden alle Verläufe als signifikant eingestuft ( $p = 0,000$ ).

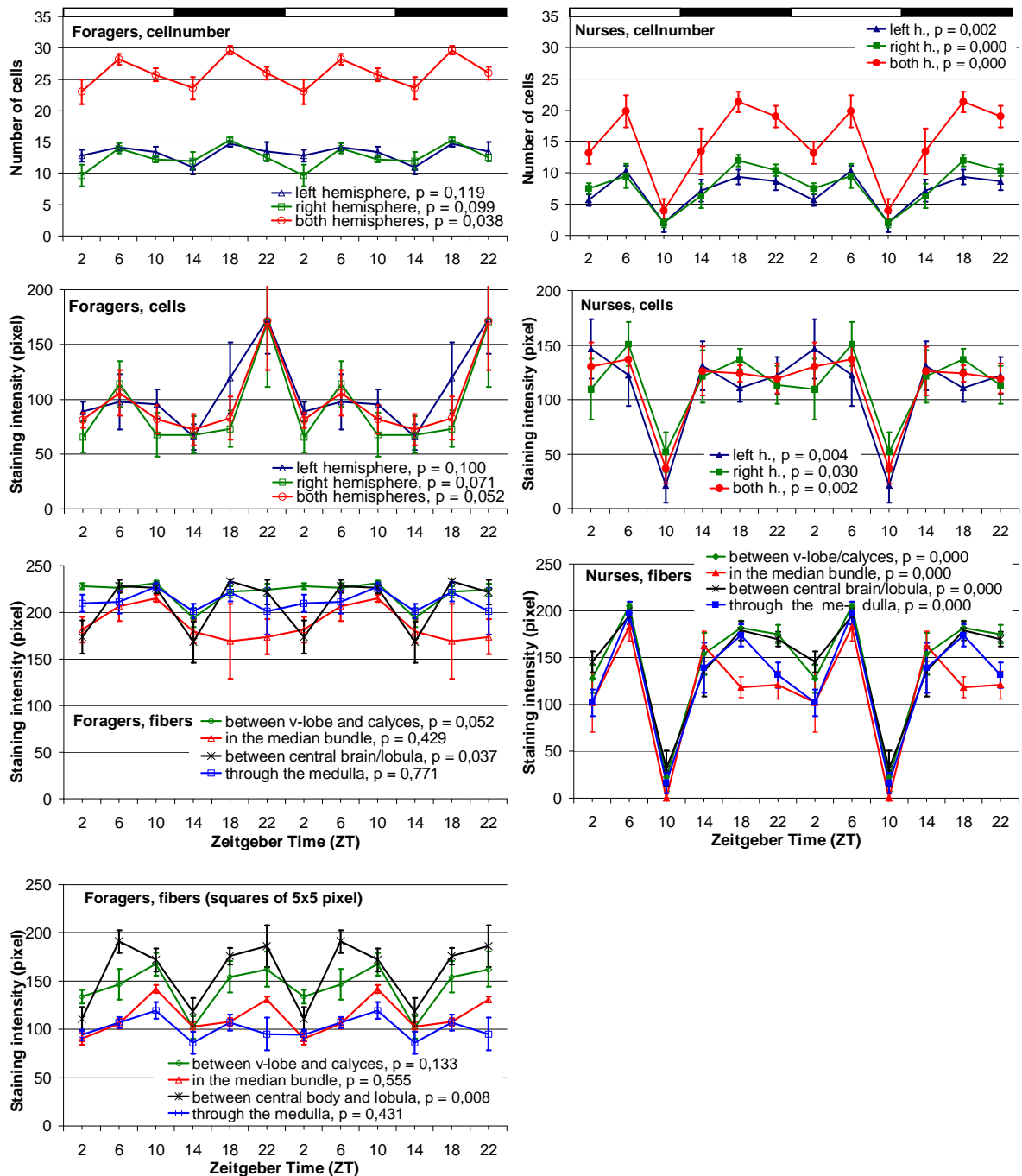


Abb. 3.2: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen anhand von sechs Zeitgeberzeiten. Alle Grafiken der linken Spalte betreffen Sammel- („foragers“), die der rechten Stockbienen („nurses“). Untereinander platziert sind: die Anzahl der PDF-Zellen („cellnumber“), die Färbeintensität („staining intensity“) des Zytoplasmas („cells“) sowie der Fasern („fibers“) der PDF-Neurone, aufgetragen gegen die Zeitgeber-Zeit (ZT) unter LD 12:12. Zudem wurden die Faserbereiche bei den Sammlerinnen um eine Grafik erweitert, die auf einer anderen Messmethode („squares of 5 x 5 pixel“) beruhen. Detaillierte Beschreibungen der Kurvenverläufe befinden sich im Text.

### 3.1.2 Sammelbienen im Vergleich LD zu DD

#### 3.1.2.1 PDF-Oszillationen bei Sammelbienen unter LD (3. Exp.)

Das dritte Experiment konzentrierte sich auf Sammelbienen, die zu den bekannten sechs Zeitpunkten (ZT2, 6, 10, 14, 18 und 22) auf eine mögliche PDF-Oszillation untersucht wurden und sollte klären, ob es sich bei den mutmaßlichen Artefakten des vorangegangenen Versuchs tatsächlich um fehlerhafte Werte handelte (vgl. 2.1.1 und 3.1.1.2).

Die Ergebnisse zu den unter LD gehaltenen Tieren sind in der Abb. 3.3 auf S. 72 aufgeführt. Alle Kurven beruhen pro Zeitpunkt auf acht Individuen, in vereinzelten Fällen auf sieben.

In der ersten Grafik der Abb. 3.3 ist die **Anzahl der PDF-Neurone** („*Cellnumber*“) gegen die Zeitgeber-Zeit (ZT) aufgetragen. Die Menge an Zellen verändert sich nur wenig über die Zeit und verläuft nicht signifikant (alle p-Werte sind deutlich größer als 0,05; siehe in der Grafik). In der linken („*left hemisphere*“, Kurve in Blau) wie auch der rechten Gehirnhälfte („*right hemisphere*“, in Grün) kommen jeweils etwa 15, in beiden Hälften zusammen („*both hemispheres*“, in Rot) 30 PDF-Neurone vor. Die geringste PDF-Zellanzahl verzeichnet man für beide Hemisphären betrachtet zu ZT22 mit 28 (ungerundet 28,4) und ZT2 mit 29 Somata (ungerundet 28,5). Die höchsten Zellzahlen erstrecken sich über die aufeinander folgenden Zeitpunkte ZT6 bis ZT14 mit 30 Somata (ungerundet 30,3 PDF-Zellkörper bei ZT6, 30,4 bei ZT10 und 29,8 bei ZT14). Die zeitliche Entwicklung der PDF-Zellanzahl in der linken und rechten Gehirnhälfte erweist sich als identisch.

Die **Intensität** der PDF-immunreaktiven Färbung im Zytoplasma der PDF-Neurone (in Abb. 3.3 zweite Grafik von oben, „*Cells - Intensity*“) – betrachtet für beide Hemisphären – hat in Bezug auf die Zeit ihr niedrigstes Level bei ZT2 ( $56 \pm 11$  Pixel), steigt zu ZT6 steil zu ihrem höchsten Punkt ( $85 \pm 16$  Pixel) an, fällt zu ZT10 wieder ab ( $67 \pm 11$  Pixel) und bleibt dann etwa auf einem Niveau, bis sie sich schließlich nach ZT22 wieder auf ihr endgültiges Minimum zwei Stunden nach Licht-an absenkt. Der rein optisch betrachtete Zyklus ist jedoch nicht signifikant (siehe p-Werte in den Abbildungen), die Fehlerbalken sind relativ groß. Pro Zeitpunkt wurden acht Sammelbienen analysiert.

Das Diagramm zum **Färbeindex** (dritte Grafik von oben, „*Cells - Index*“) beschreibt im Prinzip den wie für die Intensität erläuterten Fortgang, nur dass die Werte auf der y-Achse nach unten verschoben sind. Auch diese Kurven sind nicht signifikant.



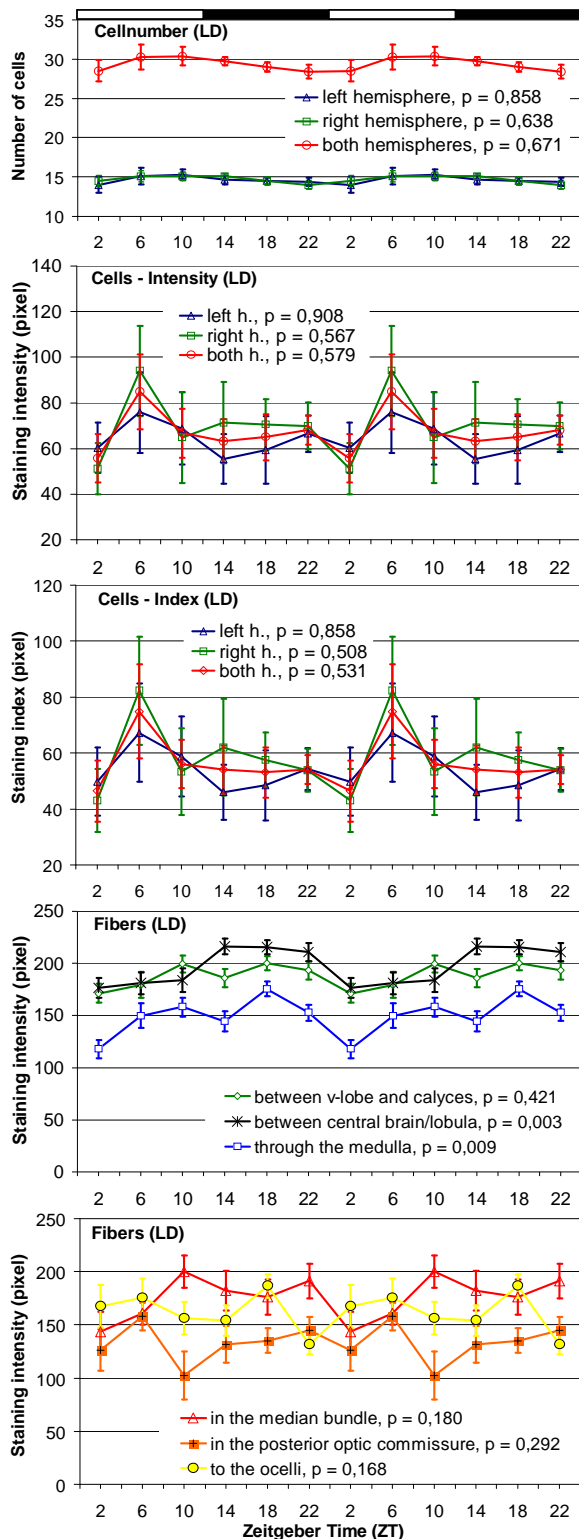


Abb. 3.3: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD anhand von sechs Zeitpunkten. Untereinander platziert sind die Anzahl der PDF-Zellen („*cellnumber*“), die PDF-Färbintensität („*staining intensity*“) und der Färbindex („*staining index*“) des Zytoplasmas („*cells*“) sowie die PDF-Färbintensität der PDF-Fasern („*fibers*“), aufgetragen gegen die Zeitgeber-Zeit (ZT) unter LD 12:12. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („*standard error of mean*“). Beschreibung siehe Text.

Die Vermessung der **PDF-Fasern** in den unterschiedlichen Gehirnbereichen (Abb. 2.5, Tab. 2.8, S. 46) ergab verschiedene Oszillationsmuster (untere zwei Diagramme in Abb. 3.3, „*Fibers*“), von denen zwei Verläufe signifikant sind. Mit einem p-Wert von 0,009 handelt es sich zum einen um die Neuriten, die die „*serpentine layer*“ der Medulla durchspannen (blauer Graf), zum anderen mit einem p-Wert von 0,003 um die gebündelt in einer Art Schleife verlaufenden Fasern zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula (schwarzer Graf). So lassen sich in den „Medullafasern“ die geringsten PDF-Mengen zwei Stunden nach Licht-an (ZT2,  $118 \pm 9$  Pixel) finden. Daraufhin erhöhen sie sich beinahe stetig, bis sie sechs Stunden nach Licht-aus, bei ZT18, ihren höchsten Wert erreichen ( $175 \pm 7$  Pixel). In den Fasern des „*Loops*“ erstreckt sich der eher flache Peak über drei Zeitpunkte von ZT14 bis ZT22 (der Reihe nach  $216 \pm 8$ ;  $216 \pm 7$ ;  $211 \pm 9$  Pixel). Während Licht-an sinkt die PDF-Konzentration abrupt auf ihren niedrigsten Wert von  $177 \pm 10$  Pixeln im Verlauf der Kurve und bleibt über die nächsten zwei Zeitpunkte, ZT6 und ZT10, auf diesem niedrigen Niveau ( $181$  und  $184$  jeweils  $\pm 11$  Pixel).

Alle anderen ausgewerteten Faserbereiche zeigen keine Signifikanzen. Die Fortsätze in den diversen Arealen haben zu differenten Zeitpunkten ihre

PDF-Färbeintensitäts-Peaks. Bei den Fasern zwischen dem v-Lobus und den Calyces (grüner Graf) existieren zwei Zeitpunkte mit gleich intensiv gefärbten PDF-Maxima bei ZT10 mit  $199 \pm 8$  und bei ZT18 mit  $200 \pm 7$  Pixeln; das PDF-Färbeintensitäts-Minimum tritt bei ZT2 mit  $171 \pm 9$  Pixeln auf. Der Kurvenverlauf, der zu den Neuriten gehört, die in die Ozellen ziehen (gelber Graf), scheint bildlich dem der Medulla zu ähneln, sein Maximalwert liegt analog bei ZT18 mit  $187 \pm 11$  Pixeln, sein Minimalwert erscheint aber bei ZT22 mit  $132 \pm 9$  Pixeln. Die PDF-Menge im „*median bundle*“ (roter Graf) präsentiert zwei höhere Peaks bei ZT10 ( $200 \pm 15$  Pixel) und ZT22 ( $191 \pm 16$  Pixel) sowie einen Tiefstwert bei ZT2 ( $144 \pm 18$  Pixel). Die höchste PDF-Konzentration in der „*posterior optic commissure*“ (orangefarbener Graf) findet sich bei ZT6 ( $158 \pm 13$  Pixel), direkt gefolgt durch die niedrigste gleich beim nächsten Zeitpunkt ZT10 ( $103 \pm 23$  Pixel).

Parallel zur Intensitätsmessung und zur Auszählung wurden die gleichen PDF-Neurone auf ihre Querschnittsfläche hin vermessen, um herauszufinden, ob eine eventuelle **Größendifferenzierung** ähnlich der Schabe (z. B. Wei et al., 2010) oder der Taufliege (z. B. Helfrich-Förster, 2007a) möglich ist. Es wurden mehrere verschiedene Aufteilungen (kleiner und größer als  $250 \mu\text{m}^2$ ,  $280 \mu\text{m}^2$  und  $300 \mu\text{m}^2$  sowie eine Dreiteilung) durchgeführt, die in Relation zu ihren Färbeintensitäten gesetzt wurden (Abb. 3.4 und Abb. 3.5 auf den Seiten 74 und 75). Keine der Größendifferenzierungen ergab eine Signifikanz (die p-Werte sind in den Grafiken integriert).

Aus der Dreiteilung (linke Spalte in Abb. 3.4) resultieren für die kleinen PDF-Neurone ( $\leq 200 \mu\text{m}^2$ , blaue Grafen) zu beinahe allen Zeitpunkten 11 bis 12 Somata, die höchste Zellanzahl liegt bei ZT18 mit 13 Zellkörpern, gefolgt von der niedrigsten bei ZT22 mit 8. Das erwähnte Minimum fällt mit dem Tiefstwert des PDF-Färbeindex für die kleinen Zellen bei ZT22 und ZT2 mit 21 und 20 Pixeln teilweise zusammen. Das Maximum von  $41 \pm 9$  Pixeln für den Index bei ZT6 deckt sich nicht mit der höchsten vorkommenden PDF-Zellanzahl. Der Höchstwert für die PDF-Färbeintensität befindet sich mit  $92 \pm 20$  Pixeln ebenfalls bei ZT6. Ein deutliches Minimum von  $56 \pm 15$  Pixeln verzeichnet man für diesen Parameter bei ZT2.

Die in der Dreiteilung mittelgroßen PDF-Neurone ( $201$  bis  $300 \mu\text{m}^2$ , magentafarbene Grafen) zeigen genau die gleiche Entwicklung in Bezug auf die PDF-Färbeintensität wie die kleinen. Prinzipiell entspricht auch der Färbeindex dem Verlauf der kleinen Zellen, jedoch ist das Maximum stärker ( $52 \pm 16$  Pixel) und das Minimum schwächer (30 und 31 Pixel) ausgeprägt. Die geringste Anzahl an mittelgroßen PDF-Neuronen erstreckt sich mit 11 Perikaryen über mehrere Zeitpunkte von ZT14 bis ZT22.

Die in der Dreiteilung als groß klassifizierten PDF-Zellen ( $> 300 \mu\text{m}^2$ , gelbe Grafen) haben ihren Höchstwert für die Zellanzahl bei ZT22 mit 11 Zellen. Beim gleichen Zeitpunkt be-

findet sich das Maximum in der zeitlichen Entwicklung des Färbeindexes ( $45 \pm 7$  Pixel), nicht aber der Färbeintensität. Der Höchstwert dieses Kriteriums liegt bei ZT6 ( $74 \pm 16$  Pixel), der Tiefstwert bei ZT18 ( $55 \pm 12$  Pixel).

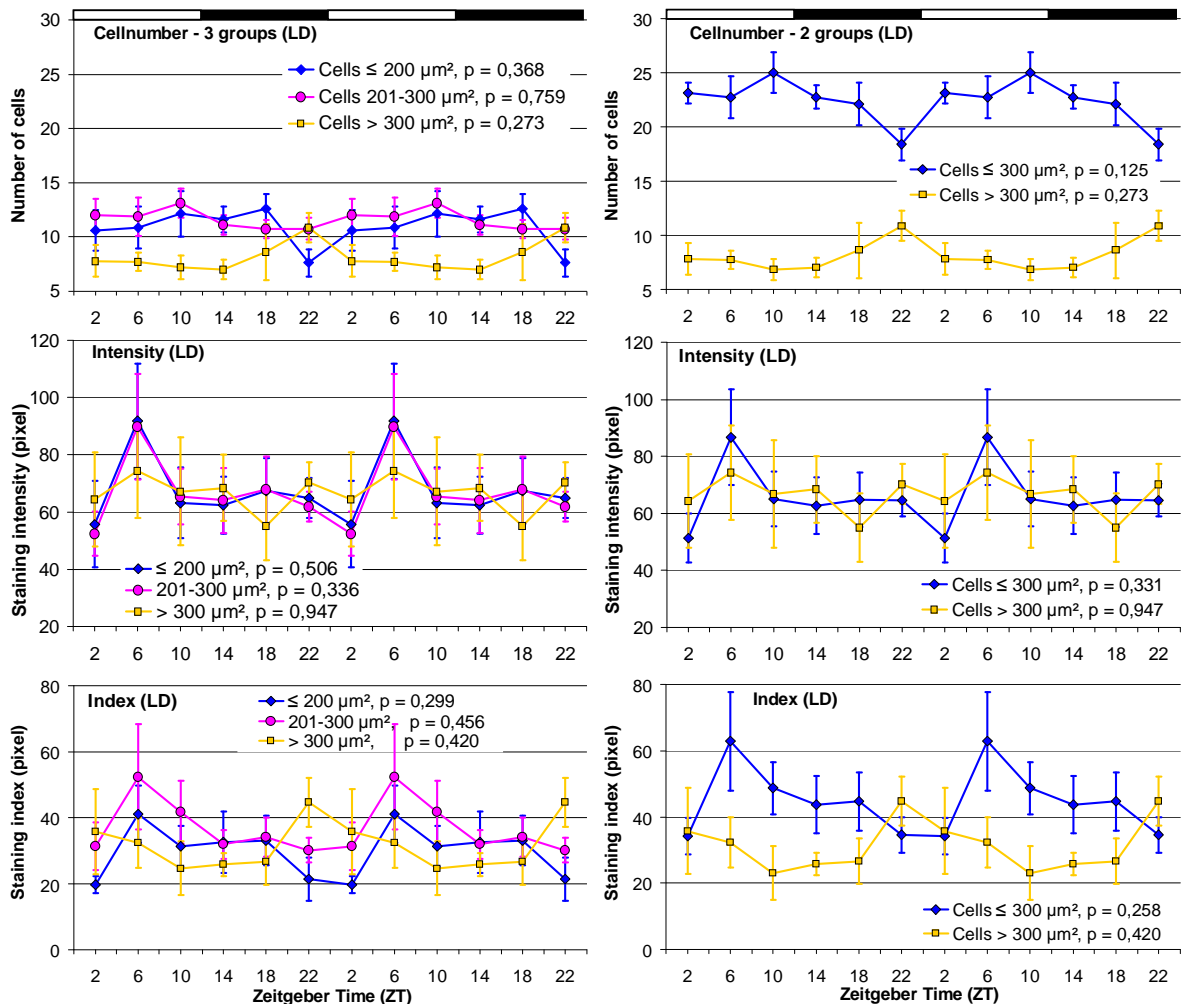


Abb. 3.4: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD nach Aufteilung der PDF-Neurone in drei und zwei (Trennung bei  $300 \mu\text{m}^2$ ) Größenklassen. Jede Spalte enthält insgesamt drei Diagramme mit von oben nach unten betrachtet der Anzahl der Zellen („cellnumber“), der PDF-Färbeintensität des Zytoplasmas („intensity“) und dem zusätzlich berechneten Färbeindex („index“). Alle Grafen sind gegen die Zeitgeber Zeit (ZT) aufgetragen, deren Hell-Dunkel-Verhältnis in einem weiß-schwarzen Balken am oberen Bildrand, parallel zur x-Achse, symbolisiert ist. Eine detaillierte Beschreibung der Kurvenverläufe ist im Text. Linke Spalte: in drei Größen klassifiziert, in Zellen mit einer Querschnittsfläche von  $\leq 200 \mu\text{m}^2$ , 201 bis  $300 \mu\text{m}^2$  und  $> 300 \mu\text{m}^2$ . Rechte Spalte: in zwei Größenklassen differenziert, in Zellen, die  $\leq 300 \mu\text{m}^2$  und in Zellen, die  $> 300 \mu\text{m}^2$  sind.

Bei der ersten vorgenommenen Zweiteilung sind die großen Zellen aus der Dreiteilung in ihrer Definition belassen ( $> 300 \mu\text{m}^2$ , gelbe Grafen in Abb. 3.4) und die kleinen und mittleren zusammengefasst worden ( $\leq 300 \mu\text{m}^2$ , blaue Grafen in der rechten Spalte). Die Maxima und Minima für die neu definierten kleinen Zellen entsprechen denen in den Diagrammen zur Dreiteilung, jedoch prägen sich die Extremwerte für die nun kleinen Zellen wesentlich deutlicher aus. Leider ergaben sich trotzdem keine Signifikanzen.

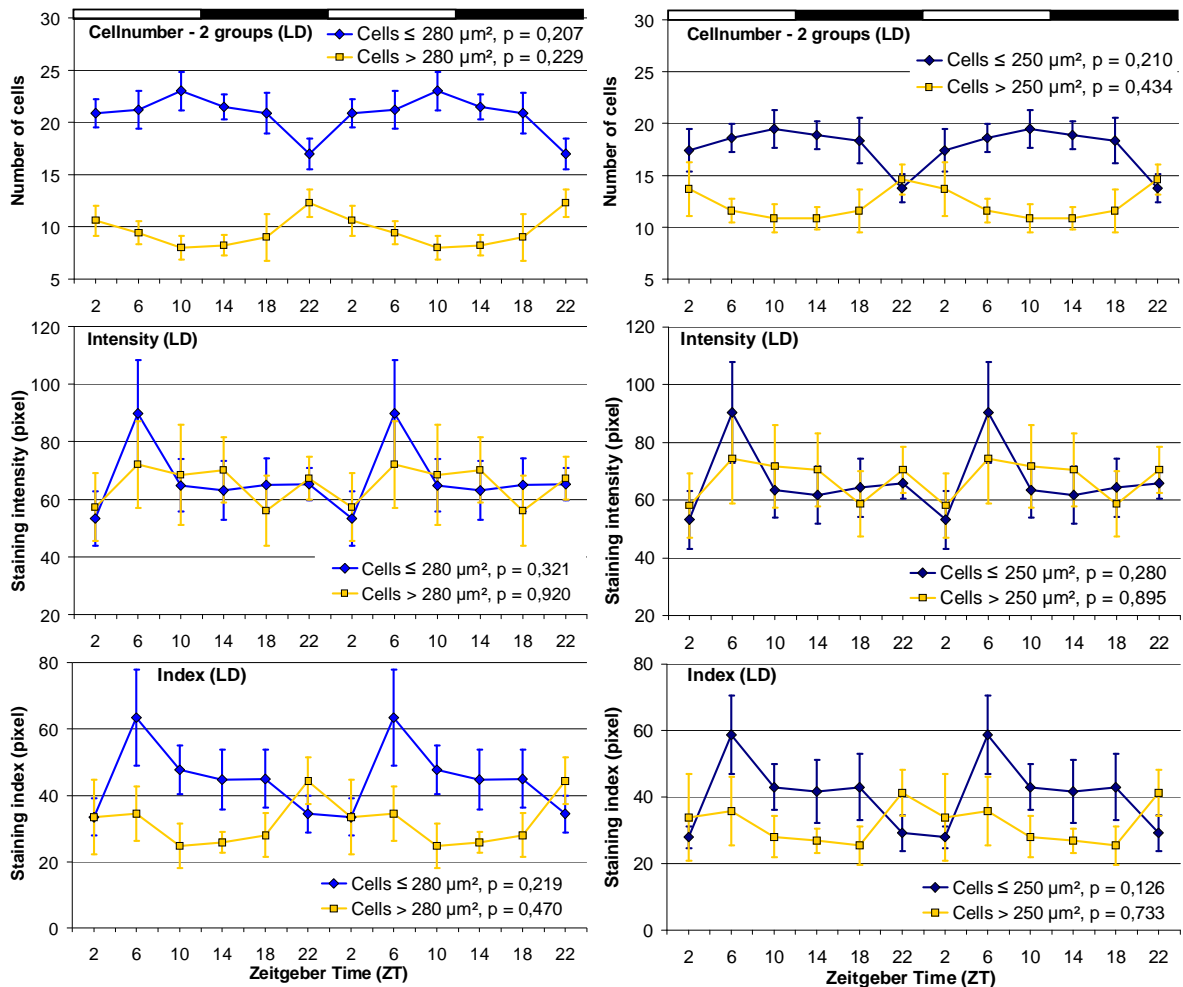


Abb. 3.5: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD nach Aufteilung der PDF-Neurone in zwei Größenklassen (Trennung bei 280  $\mu\text{m}^2$ ; 250  $\mu\text{m}^2$ ) analog der Abb. 3.4: in Zellen  $\leq 280$  und  $> 280 \mu\text{m}^2$  (linke Spalte) und in Zellen  $\leq 250$  und  $> 250 \mu\text{m}^2$  Querschnittsfläche (rechte Spalte).

Auch weitere Zweiteilungen mit der Aufspaltung bei 280 oder 250  $\mu\text{m}^2$  brachten keine signifikanten Verläufe hervor. Die Grafen sind in der Abb. 3.5 zusammengefasst. Die Zeitpunkte für Tiefst- und Höchstwerte decken sich unter allen Aufteilungen, nicht aber das Ausmaß in ihrer Ausprägung. Bei der Zellanzahl fällt wie schon bei den vorherigen Differenzierungen der Zeitpunkt, an dem das Minimum der kleinen Zellen und das Maximum der großen vorkommen, zusammen. Ein deutliches Auseinanderdriften der Grafen zeigt die Trennung in kleine und große Zellen mit der Aufspaltung bei 280  $\mu\text{m}^2$ , wobei man bei dem Minimum der kleinen 17 und bei dem Maximum der großen 12 Neurone zählt. In dem Diagramm mit der Separation bei 250  $\mu\text{m}^2$  überkreuzen sich die beiden Grafen an gleicher Stelle.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Aufteilungen entfernen sich die Grafen für große und kleine Zellen in Bezug auf den Parameter Färbeindex sichtlich voneinander, je größer der Grenzwert gewählt wird. Betragen Tiefst- und Höchstwert für den PDF-Färbeindex für die 250  $\mu\text{m}^2$ -Aufspaltung 28 und 59 Pixel, steigt er für die 280  $\mu\text{m}^2$  auf 33 und 62 und für

die 300  $\mu\text{m}^2$  auf 34 und 63 Pixel. Der Fehlerbalken misst aber in seiner größten Ausdehnung (dem 300  $\mu\text{m}^2$ -Peak von 63 Pixeln) 15 Pixel.

### 3.1.2.2 PDF-Oszillationen bei Sammelbienen unter DD (4. Exp.)

Unter LD war in zwei Faserbereichen (siehe 3.1.2.1) eine signifikante PDF-Oszillation gefunden worden. Ob es sich um eine auch im Dauerdunkel (DD) ablaufende endogene Schwingung oder um eine durch den äußeren Zeitgeber „Licht“ beeinflusste Reaktion handelt, sollte das vierte Experiment eruieren. Der Versuch fand gleich dem dritten Experiment statt, jedoch unter Ausschluss des Lichts. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.6 auf S. 77 aufgezeichnet. Die verschiedenen Untersuchungsbereiche sind analog der Diagramme unter LD dargeboten, sodass gleiche Zeitpunkte untereinander liegen. Der durchgehend schwarze Balken oben am Seitenanfang, parallel zur x-Achse orientiert, symbolisiert das Dauerdunkel und bezieht sich auf alle darunter abgebildeten Diagramme.

Auch unter Dauerdunkel bleibt die **Anzahl der PDF-Neurone** im Honigbienengehirn in etwa bei 30 (oberste Grafik in Abb. 3.6) und es ergeben sich keine Signifikanzen. Die Zellen teilen sich auf beide Gehirnhälften gleich auf (15). Es existieren in Bezug auf die circadiane Zeit (CT) und auf die Hemisphären keine Unterschiede. Ein dezentes Maximum erscheint bei CT10 mit genau 31 Somata, das Minimum bei CT22 mit ungerundet 28,7 Zellkörpern. Als Grundlage dienen 5 bis 8 Proben mit einer Ausnahme von 4 Proben bei CT22.

Dagegen zeigt sich bei der PDF-immunreaktiven **Färbeintensität** ein deutlicher Zyklus (zweite Grafik von oben). Die höchste PDF-Konzentration für beide Gehirnhälften gemittelt entspricht  $110 \pm 14$  Pixeln und wird bei CT22 verzeichnet. Schon beim nächsten gemessenen Punkt CT2 ist sie beträchtlich gesunken und erreicht bei CT6 schließlich ihren niedrigsten Wert mit  $60 \pm 6$  Pixeln. Bis CT18 nimmt die Färbeintensität mäßig aber kontinuierlich zu und gipfelt anschließend nach einem steilen Anstieg wieder bei CT22.

Im Gegensatz zur LD- (siehe Kapitel 3.1.2.1) ist die DD-Oszillation – betrachtet für beide Gehirnhälften („*both hemispheres*“) – signifikant ( $p = 0,030$ ). Erwähnenswert ist, dass die Signifikanz zwar in der rechten, nicht aber in der linken Hemisphäre auftritt. Die Fehlerbereiche sind relativ groß. Den Daten liegen pro Zeitpunkt sieben bis neun Proben zugrunde.

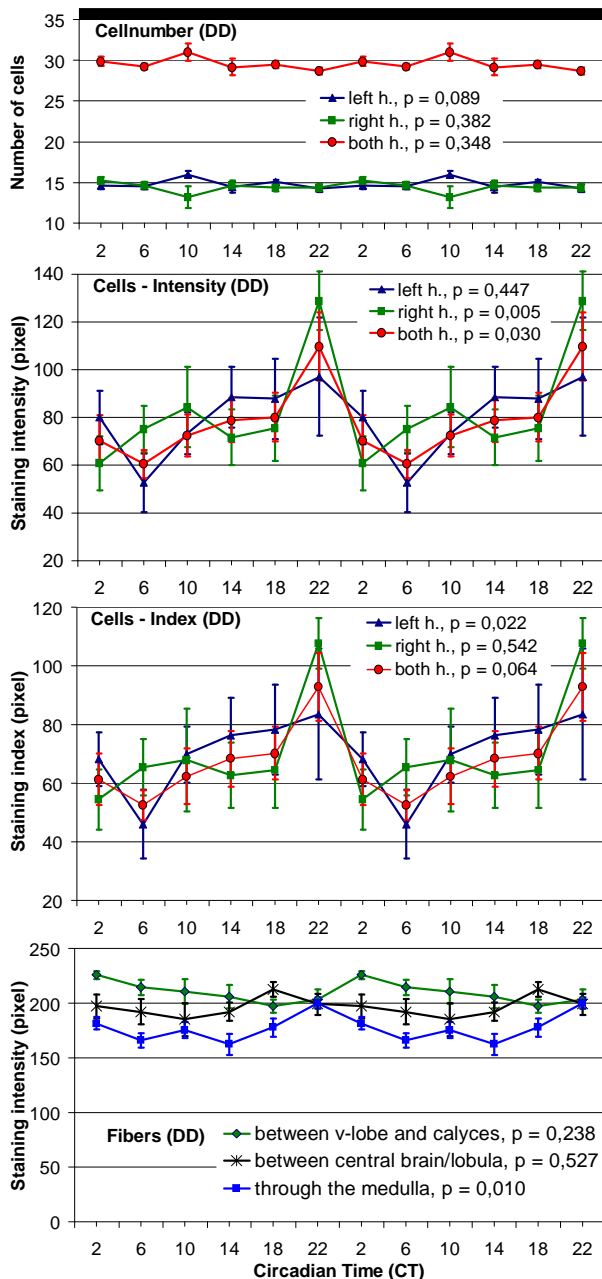


Abb. 3.6: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD anhand von sechs Zeitpunkten. Untereinander platziert sind die Anzahl der PDF-Zellen („*cellnumber*“), die PDF-Färbintensität („*staining intensity*“) und der Färbindex („*staining index*“) des Zytoplasmas („*cells*“) sowie die PDF-Färbintensität („*staining intensity*“) der PDF-Fasern („*fibers*“), aufgetragen gegen die circadiane Zeit (CT) unter DD. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („*standard error of mean*“). Eine Beschreibung der Kurvenverläufe befindet sich im Text.

Beinahe signifikant mit einem p-Wert von 0,064 erweist sich die circadian zeitliche Entwicklung des **Färbeindex** in den PDF-Zellen – betrachtet für beide Hemisphären – unter DD (in Abb. 3.6 dritte Grafik von oben). Interessanterweise zeigt sich hier eine Signifikanz in der linken ( $p = 0,022$ ), nicht aber in der rechten Hemisphäre. Der Kurvenverlauf, die Tiefst- und Höchstwerte entsprechen denen der eben geschilderten Grafen für die PDF-Färbeintensitäten (siehe Text oben und zweite Grafik („*Cells - Intensity*“)) bis auf die Tatsache, dass die Zahlenwerte nach unten verschoben sind.

Unter DD erweist sich wie schon unter LD (3.1.2.1) die PDF-Oszillation in den **PDF-Neuriten** in der Medulla (blaue Linie) als signifikant ( $p = 0,0097$ , unterste Grafik in Abb. 3.6). Die höchste PDF-Färbintensität ( $200 \pm 5$  Pixel) existiert zu CT22. Daraufhin sinkt sie über CT2 bis zu ihrem Minimum ( $162 \pm 10$  Pixel) bei CT6. Das Niveau wird in etwa bis CT14 gehalten, dann steigt die Kurve kontinuierlich wieder bis zu ihrem Höchstwert bei CT22.

Die Fasern, die im „Loop“ (schwarze Linie) entlangziehen, sind im Gegensatz zu LD unter DD nicht mehr signifikant gefärbt. Der Verlauf der PDF-Färbe-

intensität hat seinen Peak bei CT18 ( $213 \pm 7$  Pixel), senkt sich stetig bis zum niedrigsten Pixelwert von  $185 \pm 15$  bei CT10, wo er erneut bis zu seinem Maximum ansteigt. In der Grafik ist zusätzlich der PDF-Intensitätsverlauf der Fasern zwischen v-Lobus und Calyces (grüne Linie) integriert, aber auch er ist, wie schon unter LD, nicht signifikant. Die Daten

beruhen wieder auf bis zu acht Tieren pro Zeitpunkt. Da sich andere Faserbereiche unter LD als nicht signifikant herausgestellt hatten sowie aus Zeitgründen, wurden sie unter DD nicht weiter ausgewertet.

Wie schon für LD erfolgte auch für DD der Versuch, die PDF-Neurone in verschiedene **Größengruppen** zu gliedern (Abb. 3.7 und Abb. 3.8 auf den Seiten 79 und 80). Die Aufteilung der Größenklassen und die Darstellung der Diagramme entsprechen denen für LD.

Weder die Dreiteilung in kleine ( $\leq 200 \mu\text{m}^2$ , blaue Kurve), mittlere ( $201-300 \mu\text{m}^2$ , (magentafarbene Kurve) und große ( $> 300 \mu\text{m}^2$ , gelbe Kurve) Zellen noch eine der Zweiteilungen (Trennung in kleine (jeweils blau) und große Zellen (jeweils gelb) bei 250, 280 oder  $300 \mu\text{m}^2$ ) ergeben in ihrer circadianen Entwicklung der Anzahl der Zellen einen signifikanten Fortlauf (p-Werte siehe in den Abbildungen).

Unter der Dreiteilung (Abb. 3.7, linke Spalte) ist die kleinste Fraktion auch die mit der geringsten Anzahl, so existieren bei CT6 nur 5 kleine Zellen, was dem Tiefstwert der Kurve entspricht. Die Anzahl erhöht sich mit zwei Sprüngen zu CT10 und CT22 bis zum Höchstwert beim zweiten Sprung, zwei Stunden vor Licht-an, auf 13 Zellen. Der Tiefpunkt bei CT6 und der Peak bei CT22 stimmen mit dem Mini- und Maximalwert der kleinen Zellen für die PDF-Färbeintensität ( $53 \pm 12$  Pixel und  $103 \pm 30$  Pixel) sowie des PDF-Färbeindex ( $20 \pm 7$  Pixel bei CT6,  $19 \pm 6$  Pixel bei CT10 und  $47 \pm 23$  Pixel bei CT22) überein. Der Fehlerbalken bei CT22 beträgt allerdings in jede Richtung 30 bzw.

50 Prozent!

Die Anzahl an mittelgroßen Neuronen verändert sich nur geringfügig über die Zeit. So registriert man bei CT22 einen Tiefstwert mit 12 und bei CT6 einen Höchstwert mit 14 Zellen. Der Verlauf der PDF-Färbeintensität weist in etwa die gleichen Extreme auf wie bei der kleinen Zellgruppe, nämlich bei CT6 ( $57 \pm 7$  Pixel) und CT22 ( $102 \pm 16$  Pixel), wobei der Fehlerbereich deutlich geringer ausfällt. Der höchste Zahlenwert für die Berechnung des PDF-Färbeindex liegt wie bei der kleinen auch bei der mittleren Zellfraktion bei CT22 und beträgt  $59 \pm 11$  Pixel. Das niedrigste Ergebnis geht dem Peak allerdings direkt voraus und befindet sich demnach bei CT18 mit  $38 \pm 6$  Pixeln.

Die Auszählung der Gruppe großer Zellen ergab wie bei den kleinen Neuronen bei CT6 die geringste Anzahl (9), dagegen kommen die meisten großen Zellen (13 Zellen) bei CT14 vor. Bei den übrigen Zeitpunkten bleibt die Anzahl auf etwa einem Niveau zwischen 11 und 12. Der Fortlauf der PDF-Färbeintensität der großen Zellen ist signifikant ( $p = 0,004$ ). Er gipfelt in einem Peak ( $128 \pm 11$  Pixel) bei CT22 und schwankt ansonsten zwischen ca. 60 und 95 Pixeln. Sein tiefster Datenpunkt liegt bei CT10 ( $61 \pm 11$  Pixel). Die Absolutwerte für die großen Zellen in der PDF-Färbeindex-Grafik entsprechen zeitlich

denen der PDF-Färbeintensitäts-Grafik und erreichen ihren Höchstwert von  $56 \pm 10$  Pixeln bei CT22 und ihren Tiefstwert von  $32 \pm 9$  Pixeln bei CT10.

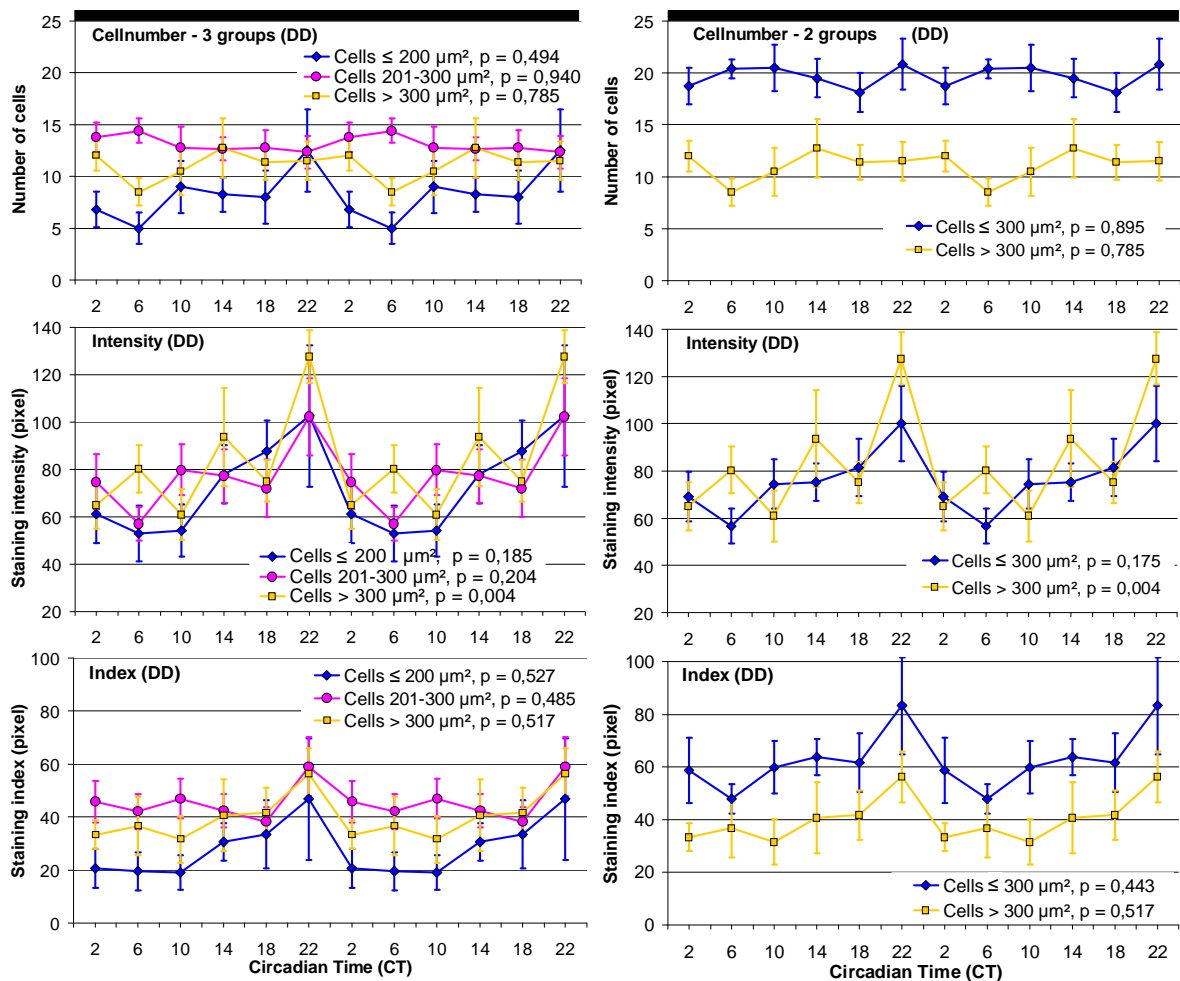


Abb. 3.7: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD nach Aufteilung der PDF-Neurone in drei Größenklassen (Zellen  $\leq 200 \mu\text{m}^2$ , 201 bis  $300 \mu\text{m}^2$  und  $> 300 \mu\text{m}^2$ , linke Spalte) und in zwei Größenklassen (Trennung bei  $300 \mu\text{m}^2$ , rechte Spalte).

Bei der ersten Zweiteilung (rechte Spalte in Abb. 3.7) wurden wie schon unter LD die kleinen und mittleren Zellen zusammengefasst und die großen Zellen, die in ihrem PDF-Färbeintensitäts-Verlauf eine Signifikanz aufweisen, belassen. Jedoch führte das nicht zu weiteren Signifikanzen (siehe p-Werte in den Diagrammen). Die gelben Kurven (große Zellfraktion) stimmen infolgedessen mit den gelben Grafen der linken Spalte der entsprechenden Abbildung überein, die blauen zeigen den zeitlichen Fortgang der neu definierten kleinen Gruppe. Die Anzahl der kleinen Zellen hat sich logischerweise erhöht, die höchste Zahl wurde wieder bei CT22 gezählt. Die Zeitpunkte für die Minima und Maxima für die PDF-Färbeintensität änderten sich nicht. Der PDF-Färbeindex prägt sich wesentlich deutlicher aus, behält sein Maximum bei CT22 und sein Minimum bei CT6. Es ergaben sich keine neuen Signifikanzen.



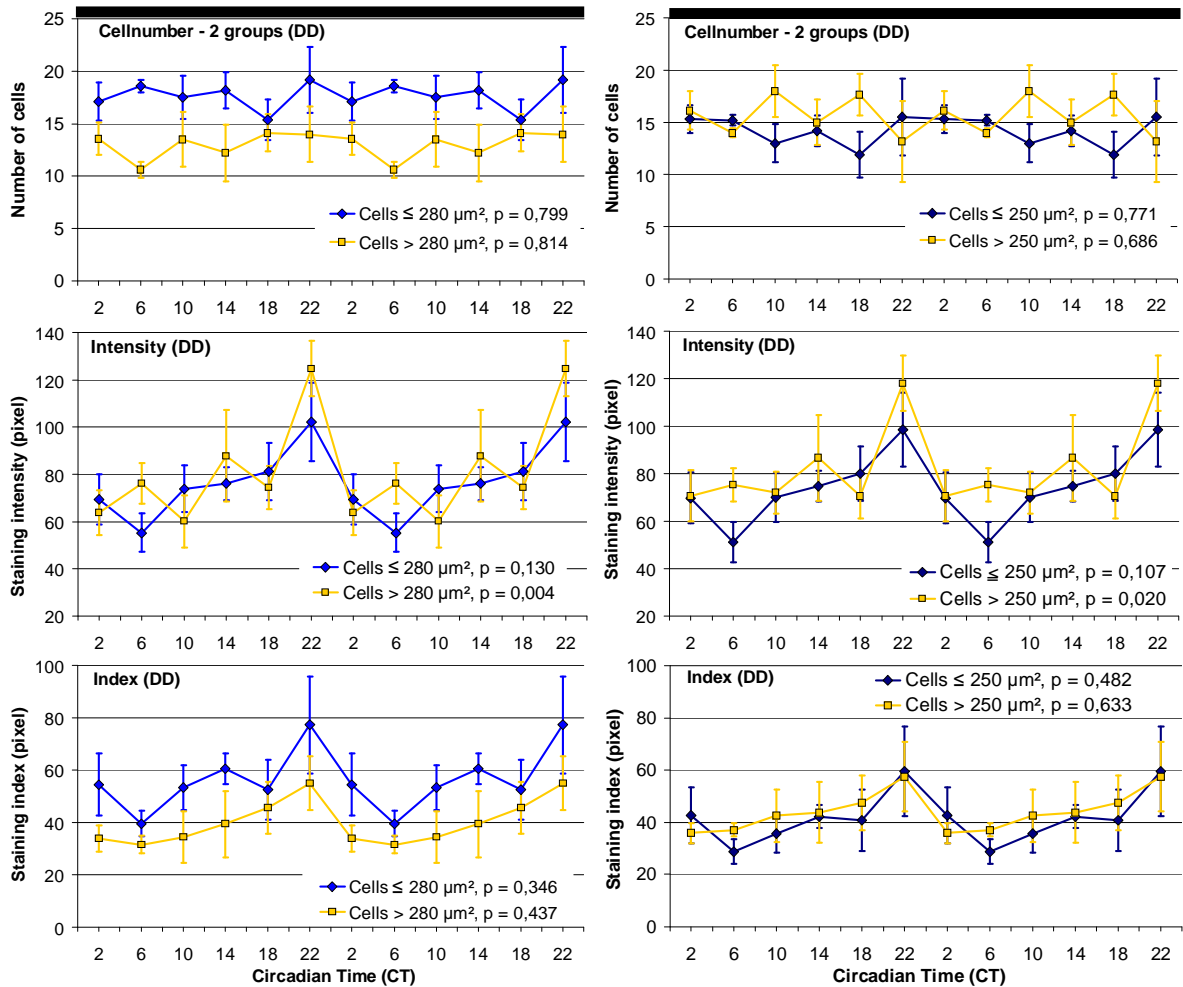


Abb. 3.8: Die PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD nach Aufteilung der PDF-Neurone in jeweils zwei Größenklassen (Trennung bei  $280 \mu\text{m}^2$ ;  $250 \mu\text{m}^2$ ). In der linken Spalte sind die PDF-Neurone in  $\leq 280$  bzw.  $> 280 \mu\text{m}^2$  getrennt, in der rechten Spalte  $\leq 250$  und  $> 250 \mu\text{m}^2$ .

Zwei weitere Einteilungen in verschiedene Größengruppen erfolgten mit den Grenzwerten  $280$  und  $250 \mu\text{m}^2$  (Abb. 3.8). In allen Fällen bleibt die Fraktion der als groß definierten Zellen im zeitlichen Verlauf der gemessenen PDF-Färbeintensität signifikant (p-Wert für die Zellfraktion  $> 280 \mu\text{m}^2 = 0,004$ ; für  $> 250 \mu\text{m}^2 = 0,020$ ), bei der Gruppe mit den kleinen Zellen jedoch nicht. Die Zellanzahl und der Färbeindex ergaben in ihrer circadian zeitlichen Entwicklung gleichfalls keine Signifikanzen.

### 3.2 Lokalisation möglicher TIM-, PER-, CRY-Neurone

Die Einfachfärbungen (die Färbungen sind als Übersicht in Tab. 2.2, S. 28 aufgelistet) mit anti-ApisTIM zeigten zu keinem Zeitpunkt eine spezifische Färbung. Auch in der Doppelfärbung mit anti-ApisCRY und anti-ApisPER waren in sämtlichen Bienengehirnen keine entsprechenden Neurone markiert. Alle diese Proben waren mit PFA fixiert worden. Die Wiederholung der Versuche, dieses Mal als Dreifachfärbung (CRY, PER, TIM), erfolgte mit in Zamboni's Fixativ behandelten Gehirnen. Es konnten wieder keine spezifisch gefärbten Neurone nachgewiesen werden. Da auch im Labor Bloch mit anti-ApisTIM keine guten Färbungen erzielt wurden (persönliche Mitteilung), erfolgten keine weiteren Versuche mit diesem Antikörper.

In der Dreifachfärbung mit CRY, PER und PDF wurden wiederholt zu keinem Zeitpunkt eindeutige CRY-Neurone gefunden. Die PDF-Neurone erschienen erwartungsgemäß, interessanterweise waren die gleichen Zellen durch anti-PER grün gefärbt, allerdings teilweise schwächer und nicht unbedingt alle PDF-Zellen (Abb. 3.9, weiße Pfeile). Dieses Phänomen konnte auch bei den PDF-Fasern beobachtet werden, die deutlich blau (PDF) gefärbt waren, zusätzlich, aber sehr viel schwächer auch grün (PER).

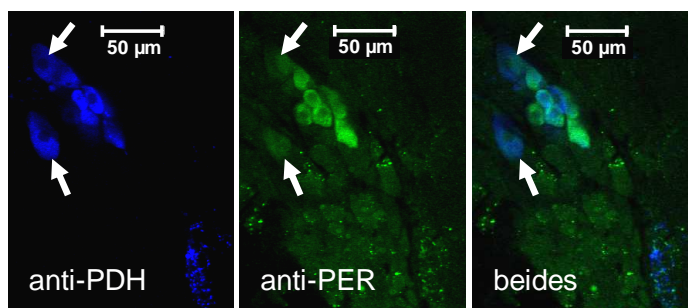


Abb. 3.9: Doppelfärbung mit anti-PDH und anti-PER: links ist nur anti-PDH eingeblendet, in der Mitte nur anti-PER, rechts beides. Manche Zellen sind durch beide Antikörper detektiert, einige durch blau markiertes anti-PDH deutlich intensiver (weiße Pfeile). Sammelbienenhirn, 7:00 Uhr.

Da es bei der Honigbiene keine *per<sup>0</sup>*-Mutante gibt, erfolgte eine Einfachfärbung auf PER und parallel dazu eine Doppelfärbung auf PER und PDF. Bei der Doppelfärbung wurden wie zuvor die PDF-Zellen detektiert (blau in Abb. 3.9) sowie mutmaßliche PER-Neurone (grün). In beiden Fällen waren nur die Zytoplasmen gefärbt. Die parallel durchgeführte PER-Einfachfärbung enthielt jedoch keine PER-Neurone. Vermutlich erkennt der sekundäre Antikörper, der die PER-Neurone detektieren soll, irgendetwas Unbekanntes in den PDF-Neuronen. Es handelt sich sicher nicht um PER-Neurone.

### 3.3 Rekonstruktion des Honigbienengehirns

#### 3.3.1 Orientierungshilfe

Um sich räumlich in den Rekonstruktionen zurechtzufinden, ist jedem „Snapshot“ ein Orientierungsquader beigelegt (siehe linke obere Ecke in Abb. 3.10).

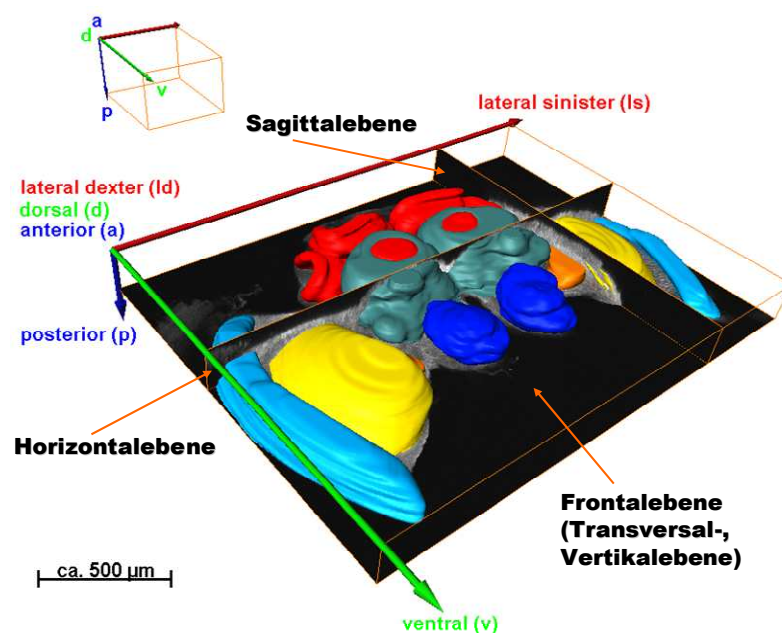


Abb. 3.10: Räumliche Ebenen im rekonstruierten Bienengehirn.

Der geometrische Körper zeigt die Seitenlagen und Ebenen im Gehirn der Honigbiene an. Er ist mit drei Achsen versehen: einer grünen für die Deklaration ventral (v) / dorsal (d), einer blauen für anterior (a) / posterior (p) und einer roten für die lateralen (l) Seiten. Links und rechts werden nur unterschieden, wenn es eine nennenswerte Rolle spielt.

Die im Bienenkopf senkrecht liegenden **Frontalebene**n entsprechen in dem untersuchten Insekt den mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommenen Schichten. Eine derartige Sektion wird definiert durch die Achsen dorsal-ventral sowie lateral sinister-dexter. In der Computersoftware Amira® stimmt diese Fläche mit der xy-Ebene überein. Die **Sagittalebene**n teilen das Bienengehirn in Längsschnitte, die von Amira® als yz-Ebenen bezeichnet und von dorsal-ventral sowie anterior-posterior eingeschlossen werden. Genau in der Mitte nennt man eine solche Fläche Medianebene, sie teilt das Gehirn anatomisch in eine linke und rechte Hälfte. Jene Hemisphären sind nicht zu verwechseln mit der oberen und unteren Hälfte, die beim Erstellen der mikroskopischen Aufnahmen entstanden sind (siehe 2.7.3, S. 50): sie bestehen nur aus Frontalschnitten. Die **Horizontalebene**n, d. h. die waagerechten Flächen, kommen in Amira® den xz-Ebenen gleich und umfassen die Achsen anterior-posterior und lateral sinister-dexter.

Der eingefügte **Messbalken** ist mit einer Circaangabe versehen. Da in einer dreidimensionalen Darstellung mit Fluchtpunkt eine bestimmte Länge im Vordergrund länger erscheint als im Hintergrund (siehe Abb. 3.70, S. 124), bezieht sich die jeweilige Längenangabe auf den Fokus der Abbildung.

### 3.3.2 Neuropile

Das Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera*, das zusammen mit dem Bauchmark das Zentralnervensystem (ZNS) bildet, umfasst drei von anterior nach posterior reichende Abschnitte: das große **Proto-**, das kleinere **Deuto-** und das sehr kleine **Tritocerebrum** (Pc, Dc und Tc; Dudel et al., 2001). Die Grenzen zwischen diesen Abschnitten sind nicht exakt zu bestimmen, vielmehr gehen sie ineinander über. Daher sind sie in den Rekonstruktionen in einer Farbe dargestellt (Abb. 3.11, S. 84, A–D, in Graublau). Konnektive verbinden Letzteres mit dem Frontal- sowie dem Unterschlundganglion, das mit den thorakalen und abdominalen Ganglien zum Bauchmark gehört. Auch das Ober- (Cerebral-) und das Unterschlundganglion sind mehr oder weniger zu einer Masse miteinander verschmolzen, in der Mitte erkennt man das Durchtrittsloch für den Oesophagus. Die Abbildungen hier enden spätestens mit dem Tritocerebrum, das Unterschlundganglion ist nicht mehr enthalten, da bei der Präparation die Schlundkonnektive durchtrennt wurden. Auch das Tritocerebrum ist vermutlich nicht vollständig vorhanden, da keine dazugehörigen, wegziehenden Nerven erkennbar sind. Das Insektengehirn wird in eine linke und rechte Hemisphäre unterteilt, die in vivo durch eine Kommissur unterhalb des Darms verbunden sind (Dudel et al., 2001).

Insektenganglien zeichnen sich durch den meist pseudounipolaren Bau der Insektenneurone aus (Mobbs, 1985). Dabei konzentrieren sich die Zellkörper in einer äußeren Schicht (Cortex), in der sie durch flächige Gliafortsätze voneinander getrennt sind. Die Nervenzellaxone dieser Somata und ihre Verzweigungen ziehen in die zentrale Struktur, wo sie synaptisch verschaltet sind. In der zentralen Masse des Cerebralganglions erkennt man deutliche Strukturen, die Neuropile genannt werden. Diese sind charakterisiert durch einen besonders hohen Grad an räumlicher Ordnung ihrer Neuriten und bestimmten Funktionszugehörigkeiten.

In Abb. 3.11, A–D, sind die wichtigsten Neuropile des Cerebralganglions einer exemplarischen Sammelbiene in unterschiedlichen Farben dreidimensional visualisiert.

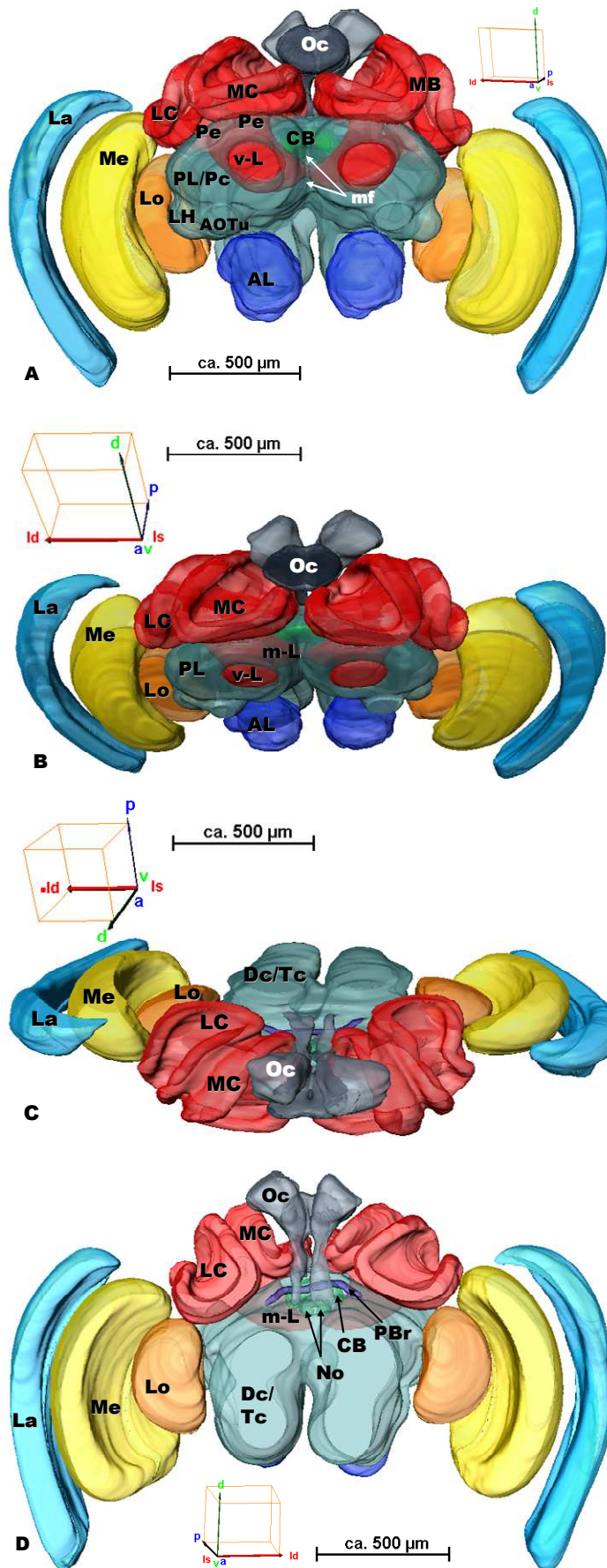


Abb. 3.11: Neuropiler Aufbau des Honigbienenhirns.

A: anterior  
B: dorsoanterior  
C: dorsoposterior  
D: posterior

Rot: Pilzkörper (*mushroom body*, MB) mit medianem und lateralem Calyx (MC, LC), den Pedunculi (Pe), dem vertikalen (v-L → zu sehen in Bild A, B) und medialen Lobus (m-L → Bild B, D).

Graublau: Proto- (Pc → Bild A), Deuto- und Tritocerebrum (Dc, Tc → Bild C, D) mit Protocerebrallappen (PL → Bild A, B). Anterior (→ Bild A), in der senkrechten Mittellinie, verläuft die „median furrow“ (mf), die ganz ventral mit der ventralen Einkerbung des Pcs („ventral crotch“, nicht beschriftet) endet. Ventral des v-Lobus ragt das anteriore optische Tuberkel (AOTu) und lateral das laterale Horn (LH) heraus (→ Bild A).

Royalblau: Antennallobus (AL → Bild A, B)

Grün: Zentralkörper (*central body*, CB), geteilt in hellgrün dargestellte „upper“ und dunkelgrüne „lower division“ (→ durchscheinend zu sehen in Bild A). Ebenfalls grün sind die zwei kugeligen Noduli (No → Bild D).

Dunkelblau: Protocerebralbrücke (*protocerebral bridge*, PBr → Bild D)

Hellblau: Lamina (La)

Gelb: Medulla (Me)

Orange: Lobula (Lo)

Grau: Ozellen (Oc)

Das **Protocerebrum** (Pc) wird in einen linken und rechten Protocerebrallappen (PL) unterteilt (Abb. 3.11, Bild A, B). Der in der Mitte liegende Bereich (*median protocerebrum*) ist anterior auffallend eingekerbt. Diese vertikal verlaufende Rille wird als „*median furrow*“ (mf) bezeichnet und trennt das Gehirn optisch in zwei Hemisphären (Mobbs, 1985). Jeder PL wird zur genaueren Beschreibung wiederum in verschiedene Areale gegliedert, die je nach räumlicher Lage als „*superior lateral*“ oder „*superior medial*“ sowie „*inferior lateral*“ oder „*inferior medial protocerebrum*“ bezeichnet werden (Abb. 3.43, S. 104). Das Protocerebrum gilt allgemein als Sitz höherer integrativer und assoziativer Leistungen. Vor allem visuelle Informationen gehen in diesen ersten Gehirnabschnitt ein, olfaktorische dagegen ins Deutocerebrum (Dudel et al., 2001).

Im frontalen Protocerebrum ragt jeweils ventrolateral des zu den Pilzkörpern gehörenden, vertikalen Lobus (v-L; Abb. 3.11, A) ein beinahe kugliger, leicht abgeflachter Höcker heraus, das **anteriore optische Tuberkel** (abgekürzt nach neuer Nomenklatur AOTu (z. B. Mota et al., 2011); nach alter AOT (Mobbs, 1985)). Es besteht aus vier verschiedenen Komponenten (Details siehe Mota et al., 2011). Dieser optische Glomerulus erhält differenzierten visuellen Input von der Medulla, der Lobula und aus dem ipsilateralen Pilzkörper. Output erfolgt ins mediane Protocerebrum (Mota et al., 2011). Ventrolateral des AOTus erhebt sich aus dem inferioren lateralen Protocerebrum (ILPr) die „*ventrolateral protuberance*“ (Mobbs, 1985) bzw. das laterale Horn (LH).

Der **Antennallobus** (AL) wird dem Deutocerebrum zugeordnet (Abb. 3.11, A, B). Er erhält über den Antennalnerv aus der Antenne olfaktorische Informationen, die er auf Interneurone und Projektionsneurone verschaltet (beschrieben in z. B. Kirschner et al., 2006). Letztere projizieren über die Antennocerebraltrakte (ACTs) zu den Pilzkörpern und ins laterale Protocerebrum. In den Antennalloben erkennt man eine artspezifische Anzahl an Glomeruli, bei der Honigbiene sind es zwischen 156 und 166. Ein dreidimensionaler Atlas zeigt die detaillierte Kartierung aller Glomeruli (Flanagan and Mercer, 1989; Galizia et al., 1999). In ihnen befinden sich die Rezeptorendigungen, die wie eben beschrieben auf Interneurone verschalten. Die Antennalloben können in zwei Glomeruli-Hemisphären unterteilt werden, in eine dorsal-caudale und eine ventral-rostrale (Kirschner et al., 2006).

Als multimodales Integrationszentrum, das olfaktorische und visuelle Erregungen koordiniert, werden die komplexen **Pilzkörper** (*mushroom bodies*, MB; Abb. 3.11, A–D) von sozialen Hymenopteren in gängigen Lehrbüchern beschrieben (Dudel et al., 2001; Erstbeschreiber war etwa 1850 Felix Dujardin). Sie sitzen im Protocerebrum und ragen dorsal mit zwei Becherpaaren (Calyces) heraus. Der jeweils median liegende Becher wird als medianer (MC), der seitlich außen folgende als lateraler Calyx (LC) bezeichnet. Jedes Paar steckt ventral mit dem Stiel (Pedunculus, Pe) im Protocerebrum. Der Pedunculus



teilt sich in den nach anterior ziehenden vertikalen Lobus (v-L) (Strausfeld, 2002; nach der Terminologie von Mobbs (1985) der  $\alpha$ -Lobus) und den zuerst nach ventral, schließlich nach median ziehenden medialen Lobus (m-L) (nach Mobbs  $\beta$ -Lobus, Bilder A, B, D). Der v-Lobus reicht bis zur vorderen Front des Kopfes, wo er abgestutzt endet bzw. leicht aus dem Protocerebrum herausragt. Fliegen besitzen nur einen, zudem deutlich kleineren Becher pro Hemisphäre (Mobbs, 1985; Strausfeld, 2002).

Die Calyces wurden in dieser Promotion nicht differenziert gezeichnet, sondern als einheitliche Struktur rekonstruiert, da die PDF-Fasern in das Neuropil nicht eintreten. Die Becher können vertikal in drei Regionen aufgeteilt werden (Mobbs, 1982). In der ganz außen, posterior befindlichen Lippenregion enden die Neuriten des Antennocerebraltrakts (ACT), der aus Ausgangsneuriten des Antennallobus besteht (siehe Abel et al., 2001; Strausfeld, 2002; Brandt et al., 2005; Kirschner et al., 2006). Fasern aus der ipsi- und kontralateralen Medulla sowie aus der ipsilateralen Lobula, also aus dem visuellen System, ziehen in die Kragenregion (Gronenberg, 1986, 2001; Strausfeld, 2002). In die „unterste“ Region, die Basalringregion, reichen „Kollaterale beider Eingänge sowie Fasern aus dem Unterschlundganglion“ (Dudel et al., 2001). Im Becher und am äußeren Rand sind die Somata der für die Pilzkörper typischen, nach seinem Entdecker benannten Kenyonzellen lokalisiert. Die Neuriten der im Becher sitzenden Kenyonzellen (der Klasse I) ziehen in ihren Becher hinein, folgen dem Pedunculus und teilen sich durch Kollaterale in den v- und m-Lobus auf, die sie dann in mehrere Richtungen (zum medianen Protocerebrum, Protocerebrallappen, kontralateralen Pilzkörper, optischen Tuberkel sowie rückkoppelnd zu den eigenen Calyces) verlassen. Im v-Lobus finden sich mikroskopisch sichtbare, parallel laufende Bänder, die den Ausgangsfasern der Lippen-, Kragen- und Basalregion ihrer Calyces entsprechen (Mobbs, 1982). Bei Dipteren existiert noch ein weiterer Lobus, der  $\gamma$ -Lobus. Strausfeld (2002) wies nach, dass bei der Honigbiene die Fasern der außerhalb des Calyx lokalisierten, die Kragen- und Basalringregion flankierenden Kenyonzellen (der Klasse II) ventral vom v-Lobus als paralleles Band verlaufen und klassifizierte sie ebenfalls als  $\gamma$ -Lobus. Dieser Lobus scheint auf den ersten Blick dem v-Lobus zu entsprechen, ist aber durch Gliazellen im Vertikalschnitt deutlich von ihm getrennt. Auf die Details der Verläufe und Verzweigungen wird hier nicht näher eingegangen, da die PDF-Fasern nicht in diese hineinprojizieren.

Ebenfalls im Protocerebrum zu finden ist der **Zentralkörperkomplex** bzw. Zentral-komplex. Er setzt sich zusammen aus vier Neuropilstrukturen: der unpaaren, auf der posterior geneigten Rückseite des Protocerebrums herausragenden **Protozerebralbrücke** (*protocerebrale bridge*, PBr; Abb. 3.11, D), dem ebenfalls unpaaren **Zentralkörper** (*central body*, CB, Bild A, durchscheinend), der sich in einen oberen und einen unteren Teil

gliedert (*upper and lower division*), sowie die posterior folgenden, paarigen, kugeligen **Noduli** (No, Bild D). Der Zentralkomplex wird aus dem medianen Protocerebrum innerviert und hat Kontakt zu Fasern aus den optischen Loben. Er ist zudem mit den lateralen akzessorischen Loben und diese wiederum mit dem Bauchmark verbunden. Daher vermutet Homberg (2004), dass die Funktionen in der motorischen Kontrolle der visuellen Orientierung und der Koordination motorischer Aktivitätsmuster, eventuell auch der räumlichen Orientierung liegen. Im Vergleich zu anderen Insektengruppen ist der Zentralkomplex der sozialen Hymenopteren eher klein (Mobbs, 1985).

Lateral des Protocerebrums setzen die größtmäßig auffälligen **optischen Loben** an, die aus den drei optischen Neuropilen **Lamina** (La), **Medulla** (Me) und **Lobula** (Lo) bestehen (Abb. 3.11, A–D). Bei Fliegen gibt es neben der Lobula noch eine Lobulaplatte, die zusammen den sogenannten Lobulakomplex bilden. Sie sind Bestandteil des visuellen Systems, dem sich nach lateral außen die Retina des Komplexauges anschließt.

Die Komplexaugen der Honigbiene setzen sich aus je etwa 5400 Einzelaugen zusammen (Menzel, 1987). Diese Ommatidien bestehen aus einem dioptrischen und einem rezeptiven Teil (Retinula). In Letzterem befinden sich u. a. die neun Photorezeptorzellen (Retinula-, Sehzellen), in deren Mikrovillisaum die Licht absorbierenden Sehpigmente vorkommen. Beim Appositionsauge der Biene bilden die Rhabdomere einen geschlossenen, zentral liegenden Stab (Rhabdom), der als Lichtleiter fungiert (Gribakin, 1975). Die Rhabdomere der Photorezeptorzellen R1 bis R8 erstrecken sich über die ganze Länge des Rhabdoms, das der Zelle R9 nur über die Basis des Ommatidiums. Die Verteilung der Photorezeptoren unter den Einzelaugen ist nicht gleichmäßig. Ommatidien vom Typ I enthalten einen UV- und einen Blau-Rezeptor, Typ II zwei UV-Rezeptoren und Typ III zwei Blau-Rezeptoren; in allen Typen sind sechs Grün-Rezeptoren existent. Die R9 scheint nach Menzel and Snyder (1974) UV- und nach Ribi (1979) UV- und für polarisiertes Licht sensitiv zu sein, Wakakuwa (2005) jedoch konnte die R9 nicht eindeutig zuordnen. Die drei Einzelaugentypen I, II und III kommen in der Retina in einem Verhältnis von 44:46:10 vor und scheinen zufällig verteilt zu sein. Nur im anterioren ventralen Komplexauge tritt der Typ III vermehrt mit 18 Prozent auf, am geringsten ist er dorsal posterior mit 3 Prozent vertreten (Wakakuwa, 2005). Die Axone der neun Retinulazellen setzen sich, die Basalmembran durchbrechend, in die Neuropile des optischen Lobus fort. Jedes Ommatidium ist in einer Cartridge verschaltet. Dabei enden sechs Fasern als „*short visual fibers*“ in der Lamina und drei, darunter die der R9, als „*long visual fibers*“ erst in der distalen Medulla (Ribi, 1979). Innerhalb einer Cartridge sind die aus der Retina stammenden Axone mit quervernetzenden Tangentialneuronen und Neuronen zweiter Ordnung aus der Medulla verschaltet (Ribi, 1975).



Die Lamina ist relativ dünn und überspannt die gesamte vertikale Länge des optischen Lobus. In ihr können drei Schichten – Stratum A, B und C – konstatiert werden. Die Differenzierung resultiert aus den Verzweigungsmustern der Neurone zweiter Ordnung. Hierbei konnte Ribi (1976) vier verschiedene Typen unter den sogenannten L-Fasern definieren. Als L-1 klassifizierte er Fasern, die in allen drei Laminaschichten Verzweigungen aufweisen, als L-4 Monopolarzellen, die sich nur in Stratum C verzweigen (weitere siehe Ribi, 1976). Die L-4 besitzen zudem lange Kollaterale, die benachbarte Cartridges erreichen.

Die Medulla besteht aus acht Schichten, die parallel verlaufen und von der distalen konvexen Seite beginnend zur proximalen konkaven Seite reichend mit 1 bis 6 bezeichnet werden (Schicht 1 und 5 unterteilen sich in a und b). Eine im Mikroskop fein granuliert erscheinende Schicht ist das Stratum 4, das auch als „*serpentine layer*“ bezeichnet wird und die distale von der proximalen Medulla trennt (Ribi and Scheel, 1981). Bei *Drosophila melanogaster* verlaufen in der Serpentine Layer tangentielle Axone, deren Zellkörper als Cluster vor der Medulla liegen und die über „*Cuccati's bundle*“ anterior in die Medulla eintreten. Einige der Zellen (die I-LN<sub>v</sub>s, siehe 1.3) schicken ihre Axone über Cuccati's Bundle schließlich in den posterioren optischen Trakt zur kontralateralen Medulla. Diese Axone entstammen der kontralateralen Medulla und Lamina (Fischbach and Dittrich, 1989).

Die Lobula hat sechs Schichten, die rechtwinklig zu den Medullaschichten verlaufen. Mehrere Fasertrakte ziehen aus ihr heraus und projizieren zum Beispiel zum äußeren Stiel des Pedunculus und bis zum inneren Calyx der Pilzkörper (Ribi and Scheel, 1981).

Zwischen Lamina – Medulla und Medulla – Lobula überkreuzen sich die Axone im ersten und zweiten bzw. im äußeren und inneren optischen Chiasma. Die Retinotopie wird in der Lamina und der Medulla aufrecht erhalten, dagegen kommt es in der Lobula zu einer starken Reduktion.

Drei einzelne **Ozellen** (*ocelli*, Oc, Abb. 3.11, A–D) sitzen im Dreieck angeordnet dorsal auf dem Apex zwischen den Komplexaugen (z. B. Goodman, 1981). Das mittlere Linsenauge liegt zwischen den Calyces, ist leicht nach anterior geneigt und wird als „*median ocellus*“ (MOc) bezeichnet. Die zwei seitlichen biegen posterior der Calyces jeweils nach lateral außen und werden „*lateral ocelli*“ (LOc) genannt. Jede Ozelle besteht aus einem dioptrischen Apparat, einer Retina mit Pigmentzellen und einem Neuropil, in das die Axone der Retinulazellen projizieren, wo sie auf Interneurone verschaltet sind. Eine Ozelle enthält eine gemeinsame Linse für alle Photorezeptorzellen. Die Linse ist nach Ribi et al. (2011) durch eine Einbuchtung in einen dorsalen und ventralen Teil gegliedert. Die Kompartimentierung setzt sich in die Retina fort, die sich in einen himmelwärts gerichteten ventralen und einen auf den Horizont gerichteten dorsalen Part teilt. Ventrale Retinula-

zellen zeigen eine dichte Pigmentierung und sind mit 25  $\mu\text{m}$  Länge kürzer als die dorsalen Retinulazellen mit 60  $\mu\text{m}$ , die zudem spärlicher, auf ihre proximalen Bereiche beschränkt pigmentiert sind. Die Brennebene der Linse liegt in den LOcs hinter der Retina und im MOc in der dorsalen Retina. Die Blickrichtung bzw. der Lichteinfall der Ozellen wird durch die sich rundum befindende Behaarung beeinflusst. Haarfreie Felder sind ventral des MOcs und lateral außen der LOcs (Ribi et al., 2011).

### 3.3.3 PDF-Zellen

Die PDF-Zellen des Honigbienengehirns sind im Cortex zwischen den optischen Loben, die jeweils aus Lamina, Medulla und Lobula bestehen, und dem Protocerebrum lokalisiert. Sie liegen anterior der Lobula über ihrer dorsalen Hälfte (Abb. 3.20, S. 93). Die bis zu 15 Zellen pro Hemisphäre sind meist in dichten Ballen angeordnet, die Lage der Somata zueinander variiert aber stark (vgl. Abb. 4.2, S. 131).

### 3.3.4 PDF-Neuriten

Die recht wenigen PDF-Neurone verbreiten den Neurotransmitter in ein weitläufiges, reich verzweigtes und mithilfe der Immunhistochemie intensiv anfärbbares Neuritennetz. Die PDF-Neuriten sind in auffallend großer Zahl beinahe im gesamten Gehirn der Honigbiene verteilt (Abb. 3.12). Besonders stark verzweigen sie sich im Protocerebrum und den optischen Loben. Außerdem ziehen sie in die Ozellen und Antennalloben. Nicht vertreten sind sie in den Pilzkörpern sowie im anterioren optischen Tuberkel.

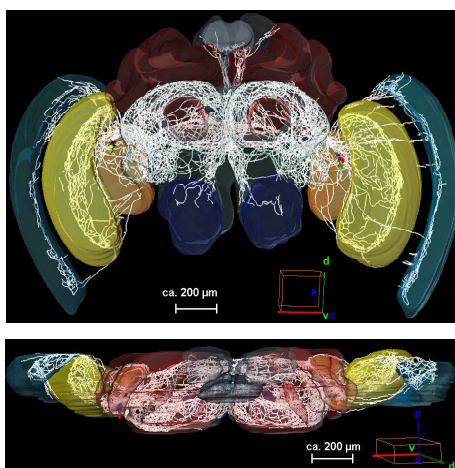


Abb. 3.12: Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene in einheitlich weißer Farbe. Oben: anterior, unten: dorsal.

Wegen der immensen Anzahl an Fortsätzen war es leider nicht möglich, einzelnen Fasern Neuropil-übergreifend und detailliert nachzugehen bzw. einzelne Projektionen zu konstatieren. Um trotzdem einen Überblick zu erlangen, sind den Neuriten je nach Neuropil unterschiedliche Farben zugeordnet (Abb. 3.13, S. 90). Beibehalten wurde eine Farbe über das Neuropil hinaus, wenn sich Fasern eindeutig verfolgen ließen. Innerhalb des Protocerebrums erhielten die Geflechte je nach räumlicher Lage wiederum verschiedene Farben, um eventuelle Projektionen präziser hervorzuheben (ab Abb. 3.52,

S. 110). Ohne die farblichen Unterteilungen wären die Verläufe aufgrund der Fülle an Fortsätzen nicht mehr nachvollziehbar.

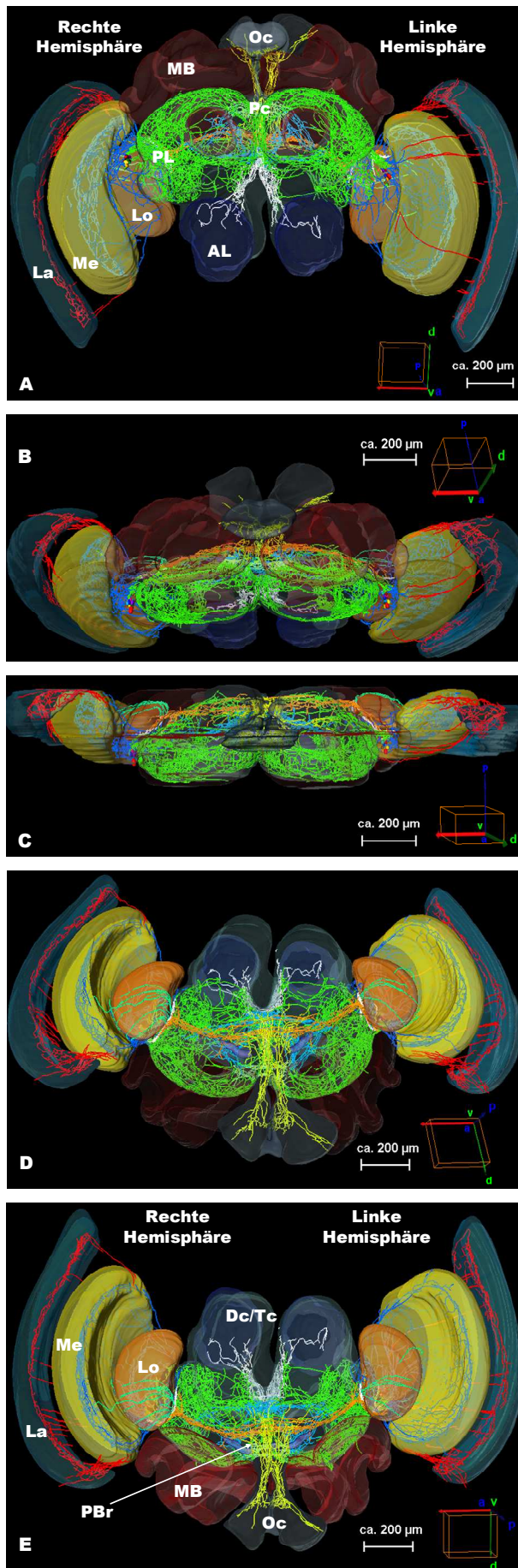


Abb. 3.13: Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene in nach Neuropilen differenzierten Farben.

Die Visualisierungen A–E präsentieren das PDF-Netzwerk in Bild ...

A: von anterior;  
B: von dorsoanterior;  
C: von dorsal;  
D: von dorsoposterior;  
E: von posterior.

PDF-Neuriten in ...

- Rot: Fasern in der Lamina (La) und zeichnerisch aus ihr heraus verfolgbar;
- Blau: Fasern in der Medulla (Me) und zeichnerisch aus ihr heraus verfolgbar (erscheinen innerhalb der Medulla hellblau);
- Türkis: Fasern, die die Lobula (Lo) posterior umwandern (→ deutlich in den Bildern C, D, E);
- Weiß (Lo): Fasern, die in einer Art Schleife (= „Loop“) zwischen Lo und Protozerebrum (Pc) entlangziehen (→ sichtbar in den Bildern C, D, E);
- Weiß (AL): Fasern, die ventral und median vom Pc in die Antennalloben (AL) projizieren (→ Bild A, D);
- Orange: Fasern, die die kontralateralen optischen Loben verbinden (posteriore optische Kommissur (POC));
- Grün: Fasern, die von den PDF-Neuronen aus direkt ins Pc projizieren und sich dort verzweigen;
- Hellblau: Fasern, die im posterioren Bereich des Pcs verlaufen und deren Projektionsmuster in jeder Hemisphäre die Form eines Dreiecks bilden (= „triangle“; sichtbar mittig im Pc in → Bild A im Hintergrund und → Bilder C, D, E);
- Gelb: Fasern, die in die Ozellen ziehen (→ Bilder A, B, D, E).

Verlaufen die Neuriten innerhalb eines Neuropils, erscheinen sie schwächer in ihrer Farbintensität als außerhalb.

### 3.3.4.1 Neuriten, die von den PDF-Neuronen wegziehen

Die zahlreichen von den PDF-exprimierenden Neuronen wegziehenden Fasern können aufgrund der engen Verläufe und der Färbung vorrangig in Varikositäten leider nicht speziellen Neuronen zugeordnet werden. Zumindest aber sind von den PDF-Zellen ausgehend zwei Projektionsrichtungen erkennbar.

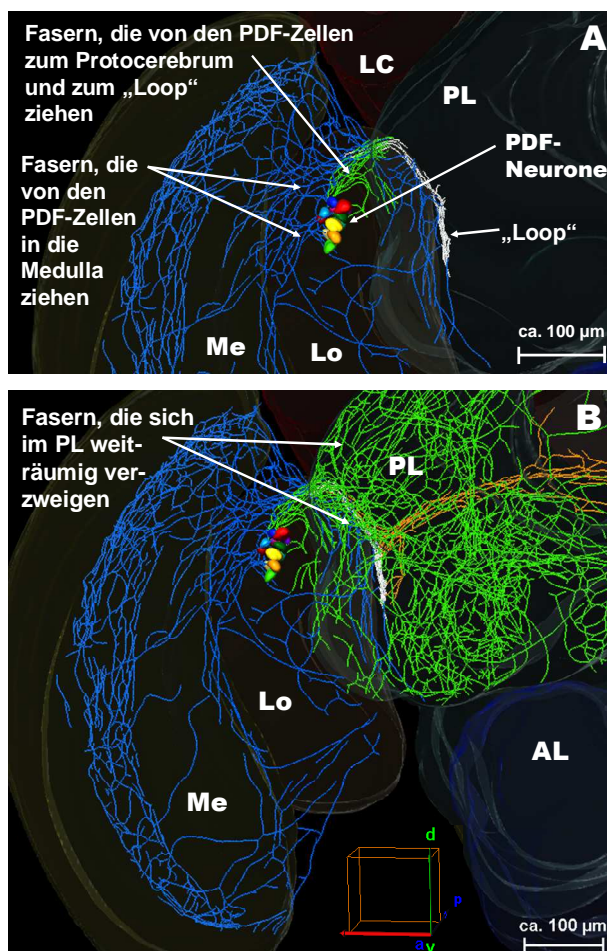


Abb. 3.14: Übersicht: Die PDF-Neurone und ihre Projektionen. Rechte Hemisphäre, anterior. **Bild A** beschränkt sich auf die von den Zellen wegziehenden Fasern. In **B** sind zusätzlich die Verzweigungen (grün) im Protocerebrallappen (PL) eingeblendet. Orange Fasern im Hintergrund: posteriore optische Kommissur.

Am Beispiel der rechten Gehirnhälfte projizieren von den PDF-Somata ausgehend zum einen mehrere Fortsätze nach lateral außen in Richtung Medulla, in die sie sich stark verzweigen (blaue, beschriftete Fasern in Abb. 3.14, A; Details in Kapitel 3.3.4.3.1 „PDF-Neuriten in der Medulla“). Zum anderen orientieren sich zahlreiche Fortsätze nach dorsal (Abb. 3.14, A: grüne Fasern). Diese Neuriten schlagen prinzipiell zwei Richtungen ein. Einerseits führen sie direkt zu einem auffallend intensiv gefärbten, breiten Faserbündel, dem „Loop“ (weiße Fasern), in dem sie sich fortzusetzen scheinen (gelber Pfeil in Abb. 3.15 und Abb. 3.16 auf S. 92). Der „Loop“ verläuft zwischen der Lobula und dem Protocerebrum und tritt nicht in die erwähnten Neuropile ein (Details 3.3.4.2 „Der „Loop““). Andererseits verzweigen sich die nach dorsal ziehenden Fasern intensiv in den Protocerebrallappen

(Abb. 3.14, B: grünes Netzwerk im PL; Details 3.3.4.4 „PDF-Neuriten im Protocerebrum“). Zunächst scheinen sie in den Protocerebrallappen nach anterior zu ziehen (Abb. 3.15, grüne Fasern). Eine nach anteriomedian geneigte Ansicht lässt allerdings zwei Projektionsrichtungen erkennen: weiterhin nach anterior sowie zudem nach median „geradeaus“ in den Protocerebrallappen hinein (Abb. 3.16). Hierbei handelt es sich jedoch um ein Darstellungsartefakt, da die abgebildeten Fasern einem separaten Modul zugeordnet wurden. Zusammen mit den eingeblendeten Nervenfasern des Protocerebrum-Moduls



(Abb. 3.14, B) erkennt man, dass sich die Neuriten nicht wie anfänglich geschildert in zwei Richtungen gabeln, sondern stark in den Protocerebrallappen (PL) verzweigen.

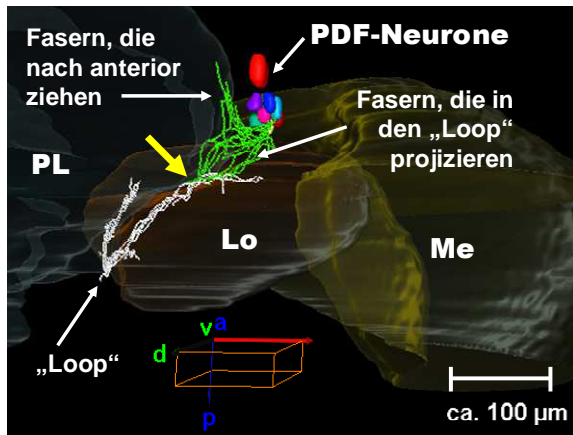


Abb. 3.15: Neuriten (grün), die von den PDF-Neuronen wegziehen. Rechte Hemisphäre, dorsal. Sie ziehen nach anterior in den Protocerebrallappen (PL) und nach dorsomedian zum „Loop“ (gelber Pfeil).

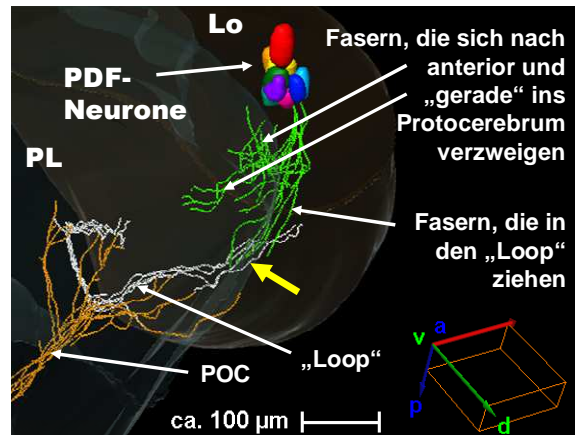


Abb. 3.16: Neuriten (grün), die sich von den PDF-Neuronen in den PL verzweigen und zum „Loop“ führen. Rechte Hemisphäre, von dorsomedian nach lateral außen. Gelber Pfeil: siehe Abb. 3.15.

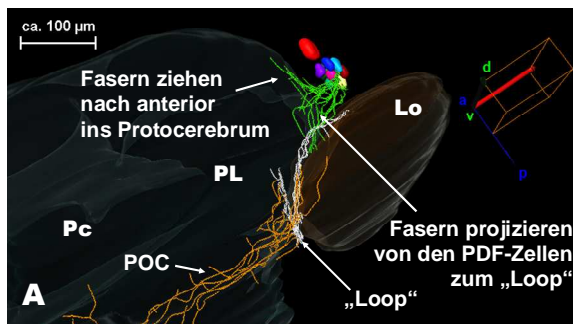
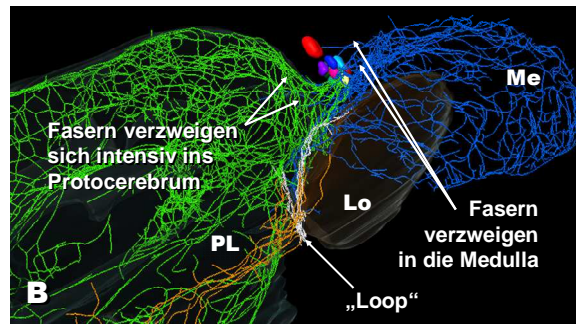


Abb. 3.17: Die von den PDF-Neuronen ins Protocerebrum und in den „Loop“ projizierenden Neuriten.

Rechte Hemisphäre, dorsal, A und B jeweils gleicher Ausschnitt und Maßstab.

**A:** Der eingblendete Kreuzungsbereich verdeutlicht den Übergang der von den Zellen kommenden Neuriten in den „Loop“ und die Orientierung nach anterior in den Protocerebrallappen (PL).

**B:** Eingblendet sind zusätzlich die Neuriten des PLs (grün) und der Medulla (blau).



Erst das Zusammensetzen der beiden Module lässt also den vollständigen Verlauf erkennen (Abb. 3.14, A → B); ohne die getrennte Darstellungsmöglichkeit wäre die Herkunft der vielen Fasern innerhalb des Kreuzungsgebiets kaum auszumachen.

Die Abb. 3.17 verdeutlicht die gleiche Konstellation nochmal aus dorsaler Sicht. Die von den PDF-Somata kommenden Neuriten teilen sich in Richtung „Loop“ und nach anterior bzw. „geradeaus“ in den Protocerebrallappen (A), wo sie sich intensiv verzweigen (B).

In der linken Hemisphäre (Abb. 3.18, S. 93) zeigt sich das gleiche Verzweigungsmuster wie in der rechten. Die Neuriten dorsal der PDF-Neurone ziehen zum „Loop“, außerdem nach anterior sowie „gerade“ weiter in den Protocerebrallappen (Abb. 3.19, S. 93).

Ebenfalls führen PDF-Fasern von den PDF-Neuronen nach lateral außen in die Medulla (Abb. 3.18 A, B: beschriftete, blaue Fasern).

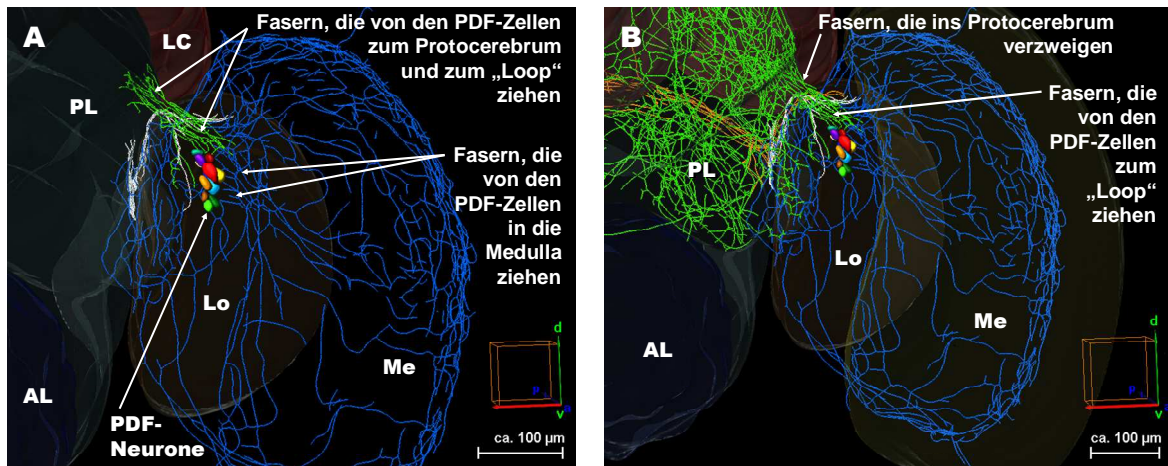


Abb. 3.18: Übersicht: PDF-Neurone und ihre Projektionen. Linke Hemisphäre, anterior. Erklärung s. Text.

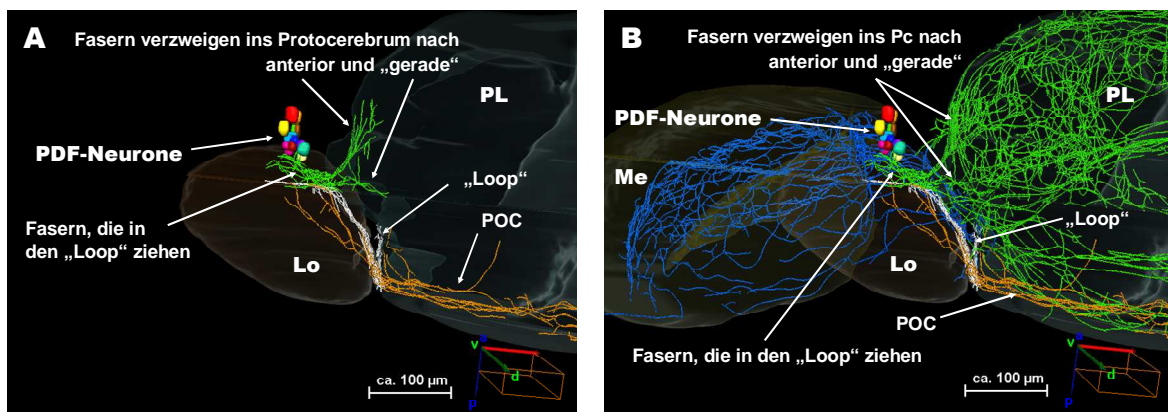


Abb. 3.19: Die von den PDF-Neuronen ins Protocerebrum und in den „Loop“ projizierenden Neuriten. Linke Hemisphäre, dorsal. **A:** Die Fasern, die von den PDF-Zellen kommen (grün), teilen sich in ein Bündel, das in den „Loop“ übergeht und eines, das sich nach anterior und „geradeaus“ in den Protocerebrallappen (PL) zeichnungsbedingt zu teilen scheint. **B:** Eingblendet sind zusätzlich die Neuriten des PLs und der Medulla.

### 3.3.4.2 Der „Loop“

Am jeweils dorsalen, medianen Rand der Lobula zieht ein deutlich gefärbter Trakt entlang, der in dieser Arbeit als „Loop“ deklariert wurde (Abb. 3.20). Das weiß nachgebildete Faserbündel bildet eine Art Schleife (Namensgebung!). Es verläuft weder in der Lobula noch im Protocerebrum, sondern zwischen ihnen (vgl. auch Abb. 3.15, S. 92 und Abb. 3.19).

Kleine Bereiche, in denen der „Loop“ die Lobula streift und scheinbar kurz innerhalb

des Neuropils verläuft, sind vermutlich Artefakte (gelber Pfeil in Abb. 3.21, S. 94 und

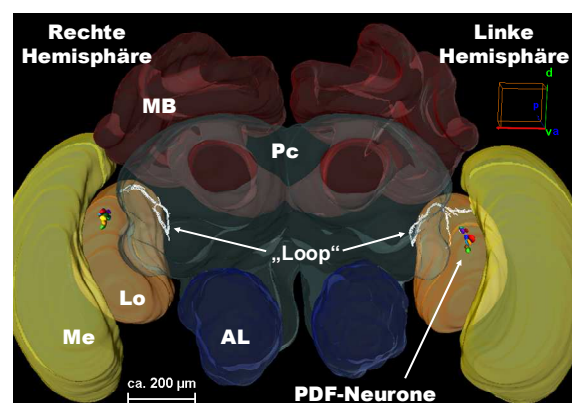


Abb. 3.20: Die Lage der PDF-Somata und des „Loops“ im Honigbienenhirn. Die PDF-Zellen liegen anterior der Lobula. Der „Loop“ verläuft zwischen Lobula (Lo) und Protocerebrum (Pc).

Abb. 3.31, S. 97). Sie entstanden dadurch, dass beim Zeichnen der Neuropiloberfläche, die aus vielen zweidimensionalen von der Computersoftware interpolierten Schichten besteht, manuell geglättet wurde. Zudem mussten die obere und untere Gehirnhälfte zusammengesetzt werden (2.7.3.4). Dabei entstand eine Kante (Abb. 3.21), deren Übergang durch künstliches Angleichen so unauffällig wie möglich gestaltet wurde; auch in diesem Bereich kann es zu dem beschriebenen Artefakt kommen.

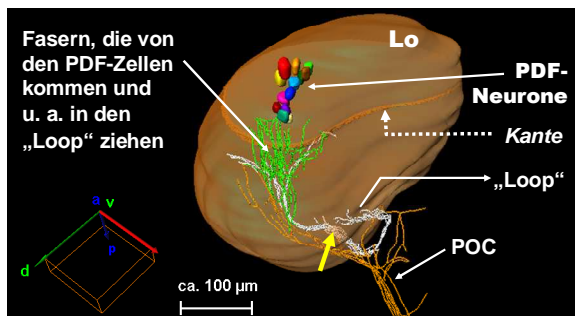


Abb. 3.21: Der Verlauf des „Loops“ (weiß) am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, von dorsomedian. Die „Kante“ entsteht durch den Aufbau aus zwei Datensätzen, d. h. der oberen und unteren Hälfte. Gelber Pfeil: Die Fasern verlaufen scheinbar im Neuropil (Artefakt durch Oberflächenbearbeitung).

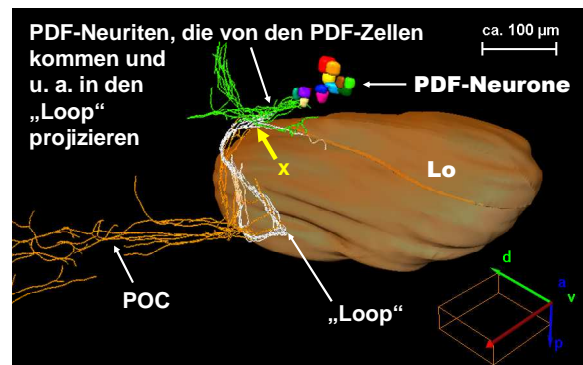


Abb. 3.22: Der Verlauf des „Loops“ (weiß) am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, von ventromedian. Gelber Pfeil mit X: Startpunkt für die Verlaufsbeschreibung (siehe Text).

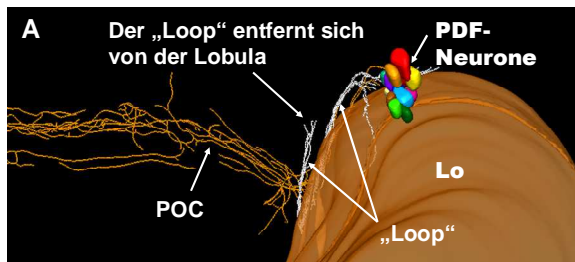
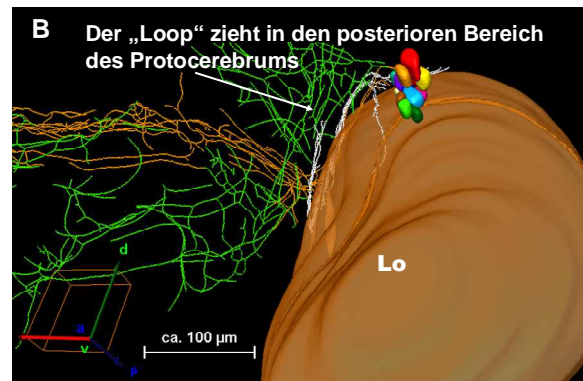


Abb. 3.23: Der Verlauf des „Loops“ (weiß) am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, anterior. Die Bilder A–B zeigen den Weiterverlauf des Faserbündels.



**Bild A:** Das „posteriore Ende“ des „Loops“ zieht dorsoposterior ins Protocerebrum (nicht eingeblendet). Die leicht transparente Lobula lässt den „Loop“ auf der verdeckten Seite durchscheinen. In **Bild B** sind zusätzlich die Neuriten eingeblendet, die im posterioren Bereich des anterioren Protocerebrums sind und Kontakte mit dem „Loop“ haben (grüne Fasern).

Der „Loop“ ist im Vergleich zu den übrigen PDF-Neuriten auffallend intensiv und als relativ „breite“ Struktur gefärbt. Während seines Verlaufs treten Fasern aus unterschiedlichen Bereichen in ihn ein bzw. in diverse Richtungen aus. In der Rekonstruktion ist er daher aus vielen hinein- und hinausführenden Neuriten gezeichnet, die in ihm mehr oder weniger parallel mitlaufen (vgl. Abb. 2.13, S. 56 und Abb. 2.18, S. 62). Die Vermutung liegt nahe, dass er aus diesem Grund prägnanter gefärbt ist.

Der ausgeprägte Trakt läuft an der median zugewandten Seite der dorsalen Lobula entlang (linke Lobula: Abb. 3.22; rechte Lobula: Abb. 3.24, S. 95). Man beginnt mit der Betrachtung des linken „Loops“ an der Stelle, an der die grün gezeichneten PDF-Neuriten,



die dorsal der Lobula aus den PDF-Zellkörpern kommen, in den weiß gezeichneten „Loop“ münden (Abb. 3.22, gelber Pfeil mit X). Zuerst zieht das Faserbündel dem Lobularand folgend nach dorsomedian, wendet sich dann nach ventroposterior und verlängert sich die Richtung haltend bis zur posterioren Begrenzung der Lobula. Dort dreht es in einer etwa 100 µm umfassenden großen Schleife zurück in Richtung dorsoanterior (siehe zudem Abb. 3.21), entfernt sich etwas vom Lobularand und nähert sich dem Protocerebrallappen (Abb. 3.23, Bild A). Dort verzweigt es sich in den „hinteren“, d. h. posterioren Teil des Protocerebrums (Bild B). In der gleichen Art und Weise gestaltet sich der Verlauf des „Loops“ in der rechten Hemisphäre (Abb. 3.24, Abb. 3.25 A–B).

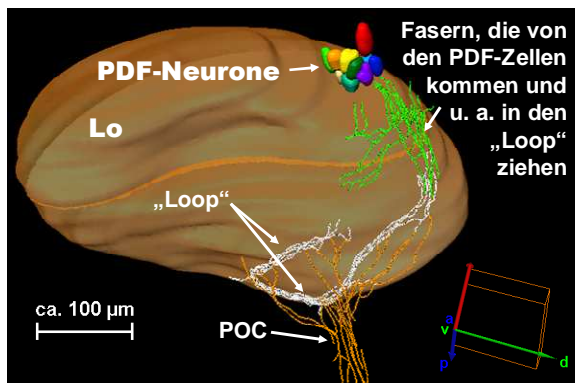


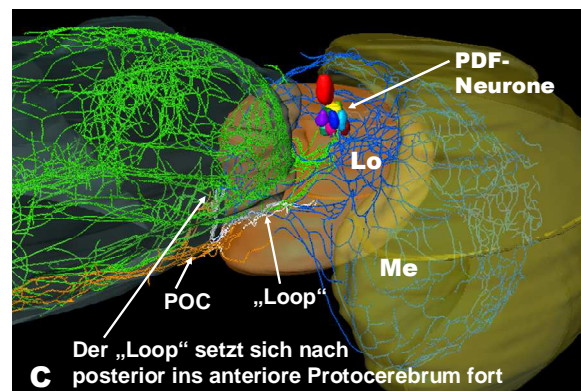
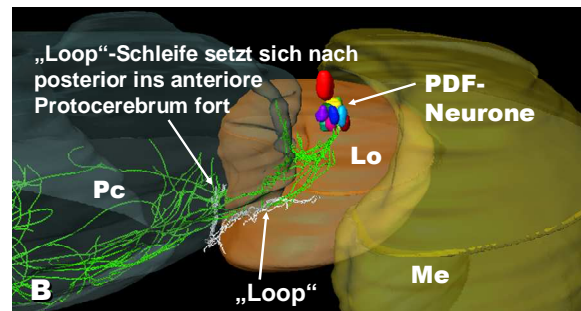
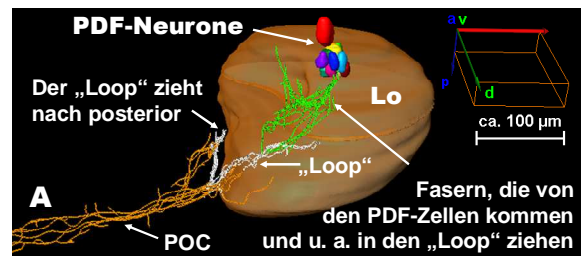
Abb. 3.24: Oben: Der Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula. Rechte Hemisphäre, von median nach lateral außen.

Abb. 3.25: Rechts, A–C: Der Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula mit weiterführenden Projektionen. Rechte Hemisphäre, dorsal. Ansicht und Maßstab sind in Bild A angegeben.

**A:** Der „Loop“ im Kontext zu den PDF-Zellen und der POC. Das „posteriore Ende“ des „Loops“ entfernt sich von der Lobula und nähert sich dem Protocerebrum (Pc, graublau eingeblendet in B und C).

**B:** Das „posteriore Ende“ des „Loops“ kontaktiert mit Fasern im hinteren Bereich des Pcs; eingeblendet sind nur die im posterioren Teil des Pcs verlaufenden Fasern und das Pc (grau) selbst.

**C:** Zusätzlich sind die Fasern des gesamten Pcs, die POC und die Medulla (Me) eingeblendet. Die PDF-Neuriten, die aus den PDF-Somata kommen, verzweigen ins laterale Pc.



Der Fortgang des linken „Loops“ von dem bekannten Startpunkt aus (gelber Pfeil mit X) in die anteriore Richtung zeigt, dass die anderen „Enden“ in die blau gemalten, der Medulla zugeordneten Fasern übergehen (Abb. 3.26, S. 96). Der Ausdruck „Enden“ bedeutet nicht, dass der Strang aufhört, vielmehr setzt er sich in weiteren Fasern fort, die aber zeichentechnisch einem anderen, in diesem Fall ausgeblendeten Modul zugeordnet sind.



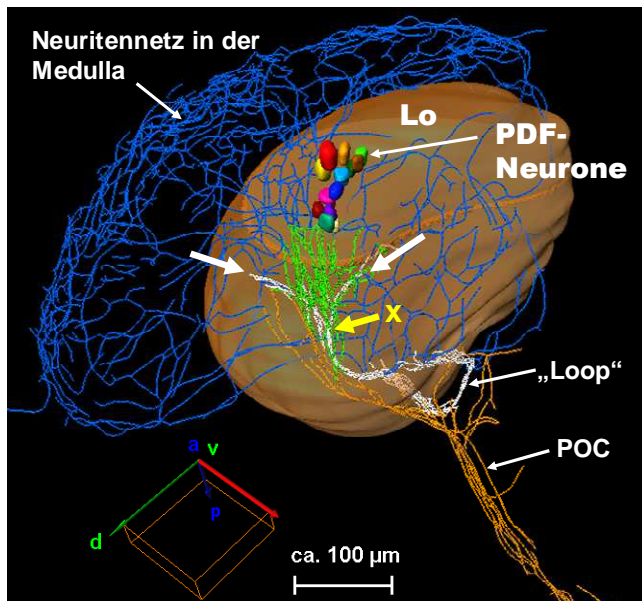


Abb. 3.26: Weiterführende Projektionen des „Loops“. Linke Hemisphäre, von dorsomedian. Der linke „Loop“ divergiert auf der anterioren Seite in das Medullanetz (weiße Pfeile). Das gelbe „X“ deutet auf den Startpunkt für die Projektionsbeschreibung (siehe Text).

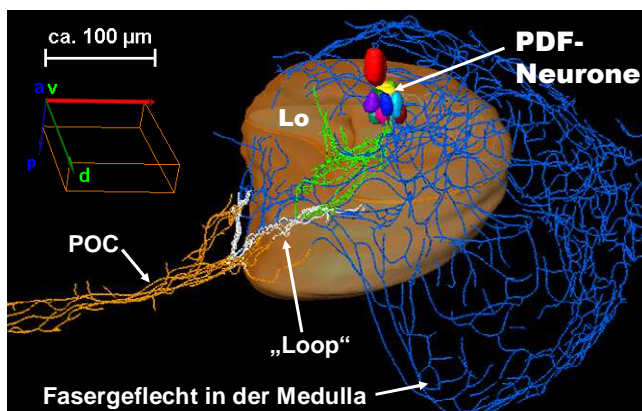


Abb. 3.27: Weiterführende Projektionen des „Loops“. Rechte Hemisphäre, von dorsomedian. Der rechte „Loop“ verzweigt sich in das Medullanetz. Erklärung siehe Text.

Dabei divergieren die „Enden“ nach dorsal und ventral und verzweigen sich in das Medulla-Netzwerk (weiße Pfeile). In der rechten Hälfte dagegen (Abb. 3.27) verästelt sich das weiß gezeichnete „Ende“ des „Loops“ direkt ohne Gabelung in das „Medulla“-Netz.

In beiden Hemisphären erfolgt der Ein- und Austritt der Fasern im Bereich des „Loops“ vielfach an den anterioren und posterioren „Enden“, jedoch auch während seines Verlaufs (Abb. 3.28 und Abb. 3.29, S. 97). In Bezug auf die Projektionsrichtung scheinen die im „Loop“ enthaltenen Fasern aus dem Trakt an unterschiedlichen Stellen herauszuziehen und sich über die Medulla netzartig auszubreiten.

In der dorsoanterior liegenden, ausgedehnten Kurve des „Loops“ besteht kein Kontakt zu den Fasern der Medulla. Hier ziehen die Neuriten unter dem Trakt hindurch, was in den Abbildungen mit einem gelb-schwarz

schräffierten Pfeil symbolisiert ist (Abb. 3.28 und Abb. 3.29).

Der „Loop“ geht nicht nur in die zur Medulla ziehenden Fasern und ins „hintere“ Protocerebrum über, sondern steht noch mit vielen anderen Neuriten in Kontakt. Einer davon ist die posteriore optische Kommissur (POC). Die kontralateralen optischen Loben sind über die POC miteinander verbunden (Abb. 3.30, S. 97). Die das Honigbienenhirn durchspannende Querverbindung verläuft posterior der Pilzkörper (MB) am hinteren Rand des Protocerebrums (Details zur POC folgen in Kapitel 3.3.4.5 „Kommissuren“).

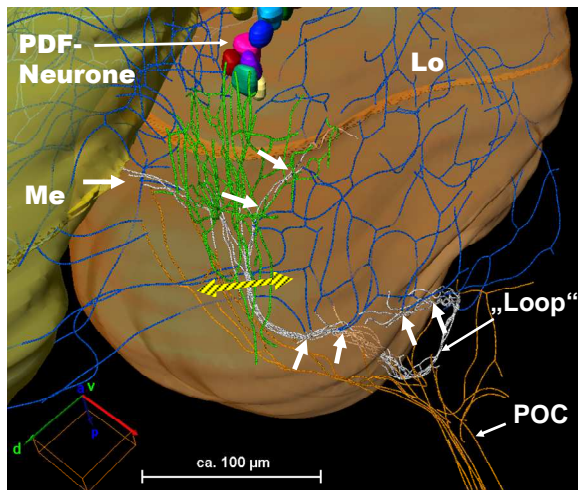


Abb. 3.28: Übergänge zwischen „Loop“ und „Medulla“-Fasern (weiße Pfeile). Linke Hemisphäre, dorso-median. Der gelb-schwarze Doppelpfeil symbolisiert, dass die blauen Fasern an dieser Stelle unter dem „Loop“ hindurchziehen.

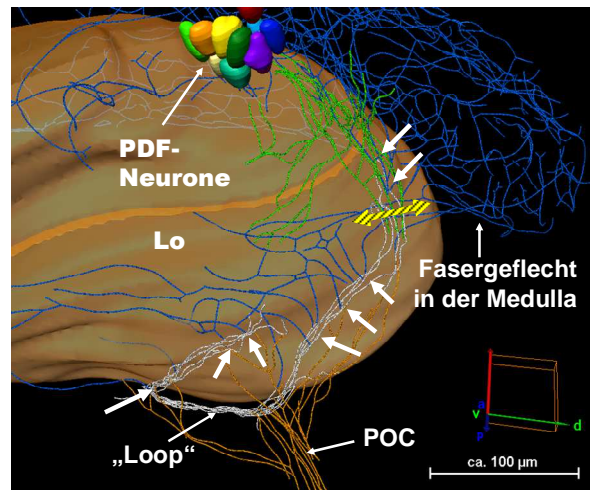


Abb. 3.29: Übergänge zwischen „Loop“ und „Medulla“-Fasern (weiße Pfeile). Rechte Hemisphäre, median. Gelb-schwarzer Doppelpfeil vgl. vorherige Abbildung. Hier ist die Medulla als Neuropil ausgeblendet.

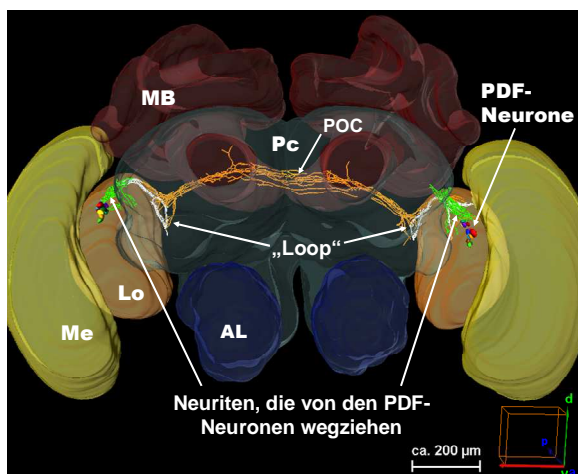


Abb. 3.30: Die Lage der posterioren optischen Kommissur (POC) im Honigbienenhirn. Sie verbindet die gegenüberliegenden optischen Loben. Eingebildet sind zudem der „Loop“ und die Fasern, die von den PDF-Zellen zum „Loop“ ziehen.

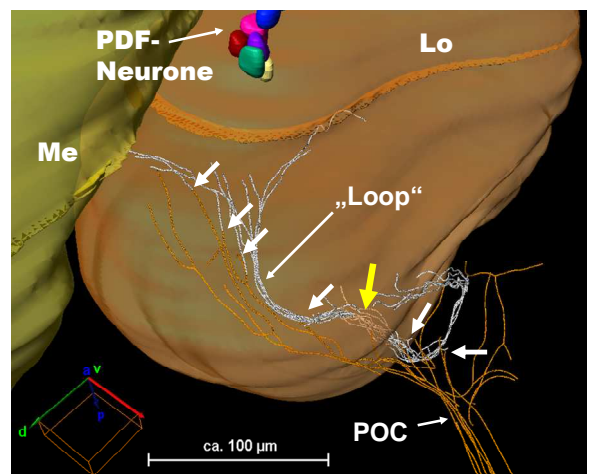


Abb. 3.31: Die POC verläuft parallel zum „Loop“. Übergänge zwischen beiden sind über die ganze Länge erkennbar (weiße Pfeile). Im Lobulainneren verlaufende Fasern sind vermutlich Artefakte (gelber Pfeil). Linke Hemisphäre von antero-dorsomedian.

Die Neuriten der POC gehen beidseitig an mehreren Stellen in den jeweiligen „Loop“ über bzw. aus der Neuritenschleife in sie hinein. Dabei verknüpfen die Fasern vor allem in der großen posterioren Kehre der Neuritenschleife, und zwar in der dorsal liegenden Biegung. Das trifft für beide Hemisphären zu. Die Abb. 3.31, in der ausschließlich der „Loop“ und die POC eingebildet sind, verdeutlicht das für die linke Hemisphäre (rechte Hemisphäre siehe Abb. 3.29). Einige Fortsätze der POC laufen parallel neben dem „Loop“, treten im Verlauf des Traktes ebenfalls in ihn hinein oder gehen, wie auch der „Loop“ selbst, in die Medulla über (Abb. 3.28 und Abb. 3.29).

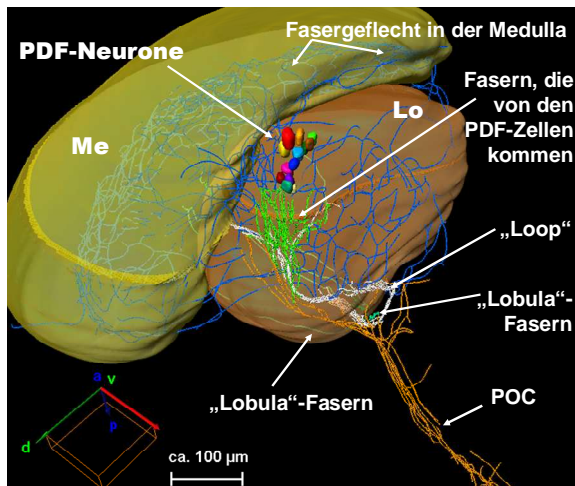


Abb. 3.32: In der posterior gelegenen Schleife des „Loops“, u. zw. in der dorsalen Biegung, sind die POC, der „Loop“ und die Fasern, die posterior um die Lobula herumlaufen, verbunden. Linke Hemisphäre, dorsoanterior.

So sind – wie in Abb. 3.28, S. 97 zu erkennen – einige dorsal verlaufende Fasern, die farblich der orangen POC zugeordnet sind, mit den blauen „Medulla“-Fasern verknüpft.

Ebenfalls in der dorsalen Biegung der posterioren Schleife sind Fasern mit der POC verbunden, die posterior um die Lobula herumlaufen (Abb. 3.32). Das genaue Projektionsmuster der Neuriten im Bereich der Lobula wird ausführlich in Kapitel 3.3.4.3.2 „PDF-Neuriten bei der Lobula“ beschrieben.

### 3.3.4.3 PDF-Neuriten in den optischen Loben

In die optischen Loben, bestehend aus Lamina, Medulla und Lobula, projizieren zahlreiche PDF-Fasern (Abb. 3.33). In den folgenden Kapiteln werden die Projektionen in die einzelnen optischen Neuropile differenziert erläutert.

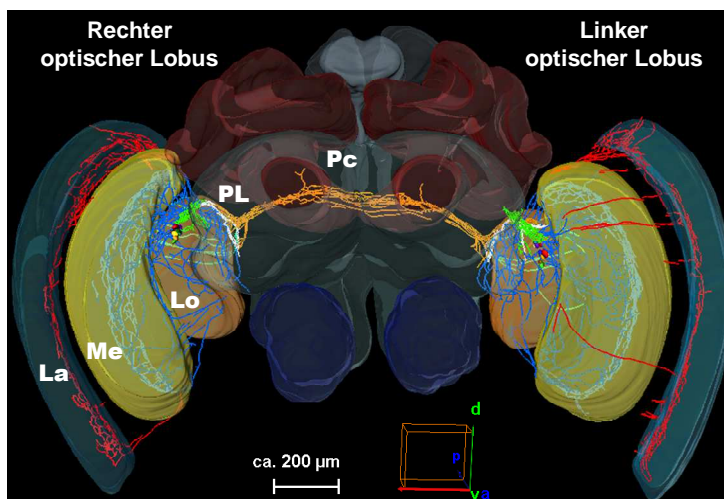


Abb. 3.33: Die PDF-Neuriten in den optischen Loben, von anterior. Ein optischer Lobus besteht aus Lamina (La), Medulla (Me) und Lobula (Lo). In allen drei optischen Neuropilen verlaufen PDF-Fasern. Die posteriore optische Kommissur (orange Fasern) verbindet den rechten und linken optischen Lobus und damit die kontralateralen Seiten.

Die PDF-Neuriten umfassen in der Lamina und der Medulla die gesamte dorsoventrale Ausdehnung. In der Medulla ziehen sie ausschließlich durch eine spezielle Schicht, die „serpentine layer“ (3.3.4.3.1 „PDF-Neuriten in der Medulla“). Auch in der Lamina sind sie lagespezifisch begrenzt (3.3.4.3.3 „PDF-Neuriten in der Lamina“). Die Lobula wird von ihnen nicht passiert, vielmehr nur umspannt (3.3.4.3.2 „PDF-Neuriten bei der Lobula“).



### 3.3.4.3.1 PDF-Neuriten in der Medulla

Wie bereits in Kapitel 3.3.4.1 beschrieben, führen zahlreiche PDF-Neuriten aus den PDF-Zellkörpern unter anderem nach lateral außen in Richtung Medulla. Sie verzweigen sich und bilden ein weitläufiges Netz, das hauptsächlich dorsolateral der Zellen, aber auch ventral in die Medulla übergeht (Abb. 3.34, A, B).

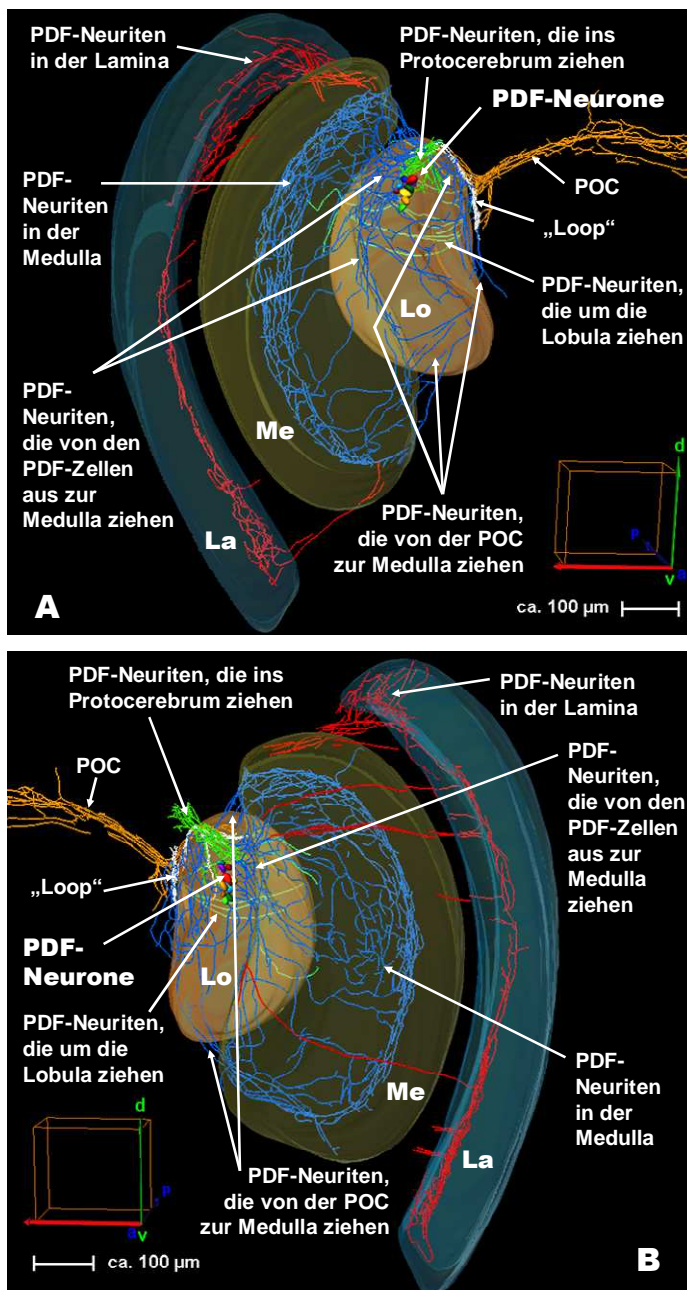


Abb. 3.34: Optischer Lobus mit PDF-Neuriten. Rechte (**Bild A**) und linke (**B**) Hemisphäre, anterior.

Dorsal sowie ventral auf Höhe der Lobula ziehen zudem Fasern heran, die von kontralateral über die POC und den „Loop“ zu kommen scheinen. Teilweise verästeln sich einige Fasern schon vor Eintritt in die Medulla. Sie durchziehen das zweite optische Neuropil in seiner gesamten dorsoventralen Ausdehnung.

In Abb. 3.35, S. 100, ist die Medulla transparent visualisiert, die in ihr liegende „serpentine layer“, die die distale von der proximalen Medulla trennt, dagegen als leicht durchsichtige, gelbe Struktur. Sowohl auf der konvexen Außen- (Bild A) als auch in der konkaven Innenseite (B) tauchen die blau gezeichneten Medullafasern in sie ein. Die PDF-Fasern verlaufen folglich in der Medulla ausschließlich innerhalb der Serpentine Layer. Sie treten in sie ein über die dorsale, ventrale sowie über die gesamte Länge der median orientierten Innenkante des Neuropils. Innerhalb der Serpentine Layer sind sie reich verzweigt.

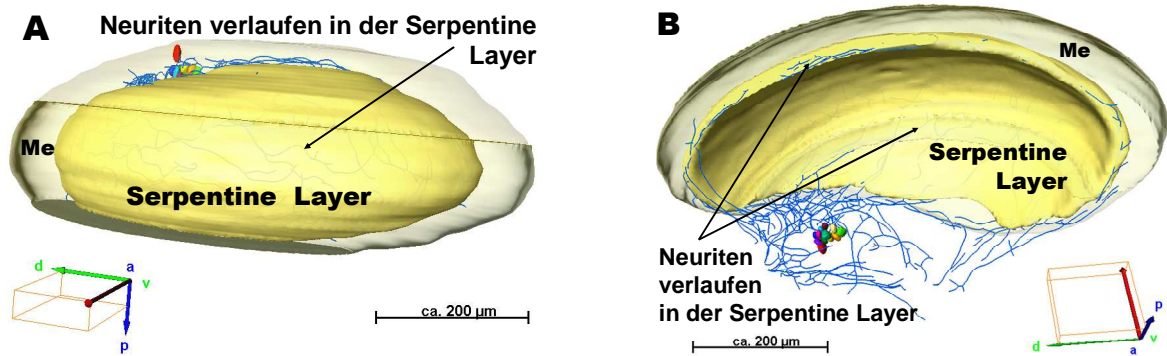


Abb. 3.35: Die transparent dargestellte Medulla mit der Serpentine Layer in gedeckter, schwach transparenter Farbe. Rechte Hemisphäre. Da die PDF-Fasern innerhalb der Serpentine Layer verlaufen, verschwinden sie darin bzw. schimmern nur zart durch.

A: von lateral außen nach median betrachtet; B: von posterior-median nach lateral außen betrachtet.

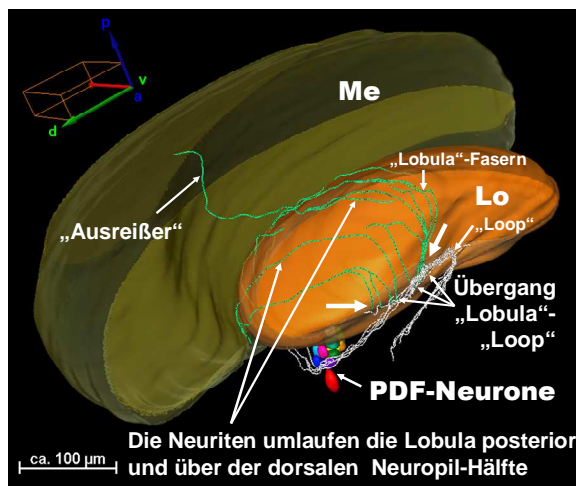


Abb. 3.36: Das PDF-Projektionsmuster im Bereich der Lobula. Rechte Hemisphäre, posterior-median. Die Fasern umlaufen die dorsale Hälfte des Neuropils auf der posterioren Seite. Die weißen Pfeile schließen die Kontaktzone der „Lobula“-Fasern mit den Fasern im „Loop“ ein.

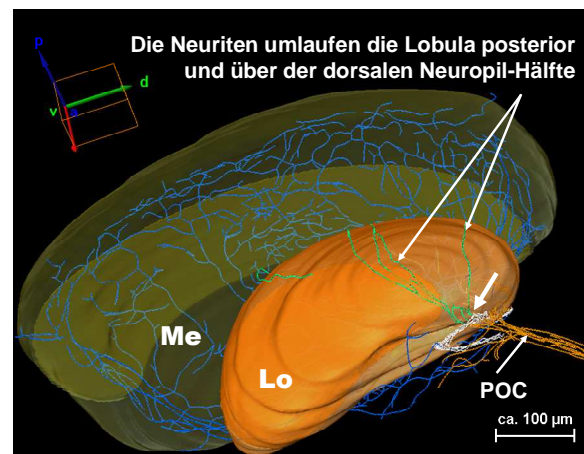


Abb. 3.37: Das PDF-Projektionsmuster im Bereich der Lobula. Linke Hemisphäre, posterior-median. Weißer Pfeil: Kontakt Lobula – „Loop“. Die Verbindungen der „Lobula“- mit den Medulla-Fasern am lateralen Außenrand fehlen oder sind nicht gefärbt.

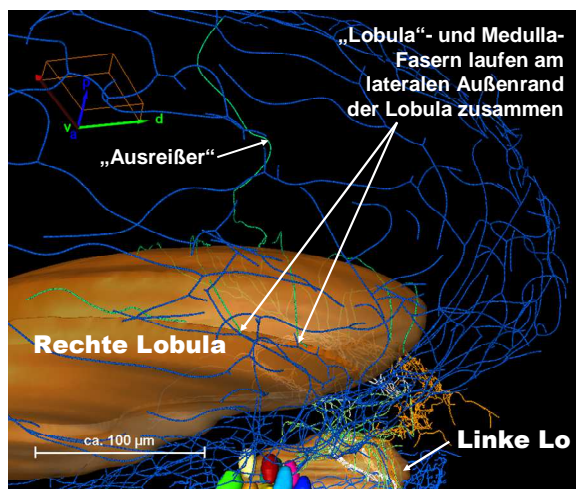


Abb. 3.38: Im Vordergrund die lateral außen liegende Seite der rechten Lobula mit den Übergangsstellen der „Lobula“- und Medulla-Fasern.

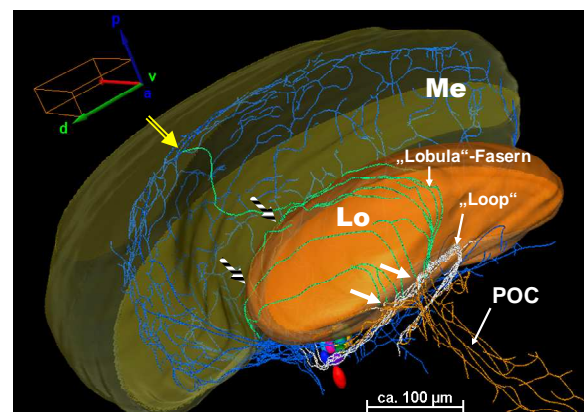


Abb. 3.39: Ausschnitt wie Abb. 3.36. Weiße Pfeile: Die POC kontaktiert mit dem „Loop“ im gleichen Bereich wie die „Lobula“-Fasern. Schwarz-weiße Pfeile/gelber Rahmenpfeil: Kontaktstellen der „Lobula“-Fasern mit den Fasern in der Medulla.

#### **3.3.4.3.2 PDF-Neuriten bei der Lobula**

In der Lobula selbst verlaufen keine PDF-Neuriten. Die Fortsätze umgehen das dritte optische Neuropil und führen unmittelbar an dessen Rand entlang (rechte Lobula: Abb. 3.36; linke Lobula: Abb. 3.37, S. 100). Es handelt sich um wenige, bis zu etwa zehn Neuriten, die die Lobula auf der posterioren Seite umlaufen. Dabei beschränken sie sich auf die dorsale Hälfte des Neuropils. Die „Lobula“-Fasern verbinden den „Loop“ mit der Medulla.

In beiden Hemisphären erstreckt sich die Kontaktzone zwischen „Loop“ und „Lobula“-Fasern auf ungefähr 100 µm und befindet sich in der posterior gelegenen 180°-Kehre des „Loops“, und zwar in der dorsalen Biegung (Abb. 3.36, Abb. 3.37). In diesen Bereich münden (und/oder gehen heraus) gleichfalls die Fasern der POC (Abb. 3.39, S. 100 sowie Kapitel 3.3.4.2). Hauptsächlich laufen die „Lobula“- und die Medulla-Fasern am lateral außen liegenden Rand der Lobula und am konkaven Innenrand der Medulla zusammen. Dieser Bereich ist in Abb. 3.39 durch die Lobula verdeckt; die schwarz-weißen Pfeile deuten in die Richtung. Die Abb. 3.38 (ebenfalls S. 100) zeigt das zeichentechnische Ineinanderübergehen dieser Fasern. In der rechten Hemisphäre zieht ein einzelner „Ausreißer“ zur Medulla (Abb. 3.36) – in Laufrichtung vom „Loop“ aus betrachtet – schwenkt nach posterior und tritt an der äußeren Kante der Medulla in die Serpentine Layer ein (Abb. 3.39: gelber Rahmenpfeil am Medulla-Rand).

Diese Faser fehlt auf der linken Seite bzw. ist, da kein färbbares PDF enthalten ist, nicht markiert. Die in der rechten Gehirnhälfte deutlichen „Lobula“-Fasern auf der lateralen Außenseite der Lobula sind in der linken Hemisphäre nicht durchgängig verfolgbar. Die Fasern sind zwar prinzipiell vorhanden, führen analog der rechten Hemisphäre posterior um die Lobula herum, eine eindeutige Verbindung mit der Medulla ist aber nicht angefärbt (Abb. 3.37).

Auf der anterioren Seite der Lobula befinden sich viele Neuriten, die aber, da sie von den PDF-Neuronen ausgehen und in die Medulla hineinziehen, zeichentechnisch zu letzterer zugeordnet wurden. Weitere anterior über der Lobula liegende Fortsätze, die zwischen „Loop“ und Medulla ein Netz bilden, wurden ebenfalls dem zweiten optischen Neuropil zugerechnet.



### 3.3.4.3.3 PDF-Neuriten in der Lamina

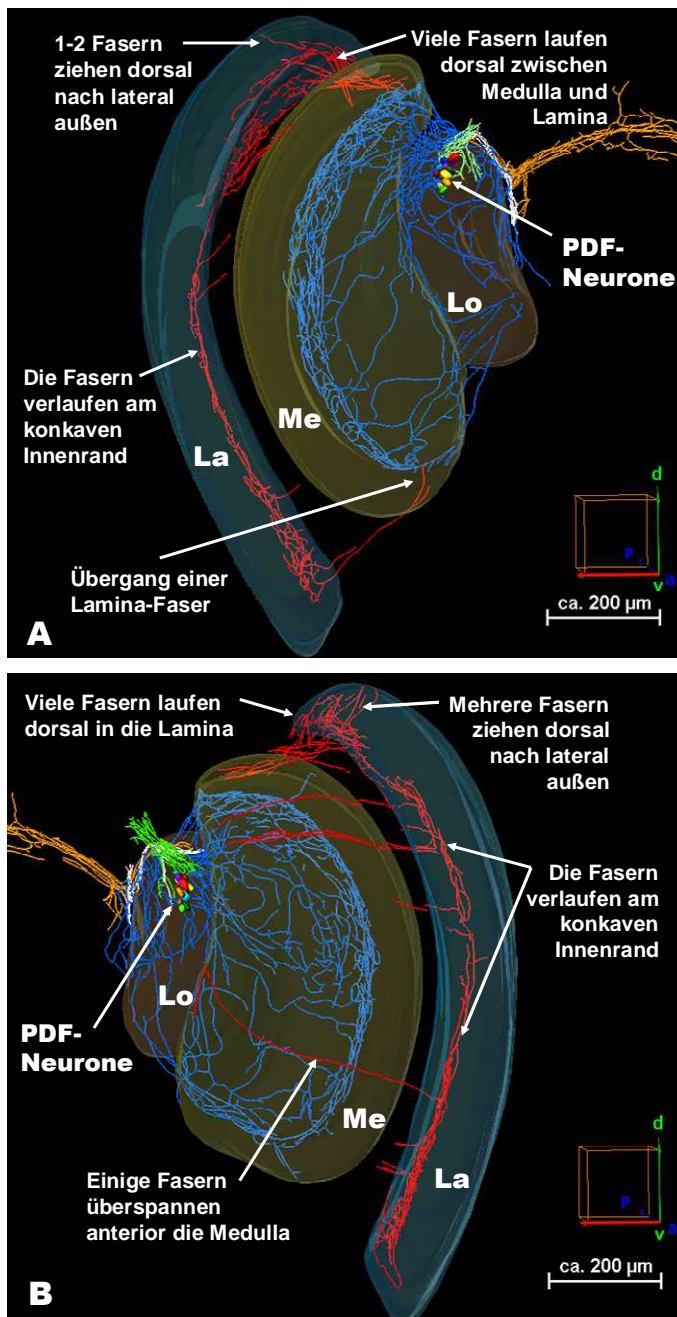


Abb. 3.40: Das PDF-Projektionsmuster in der Lamina.  
**A:** Rechter optischer Lobus. **B:** Linker optischer Lobus.

In der Lamina verlaufen die PDF-Neuriten dorsal-ventral ausgerichtet (Abb. 3.40). Sie treten hauptsächlich dorsal und nur vereinzelt ventral in das äußere optische Neuropil ein. Ob sie direkt von den PDF-Neuronen und/oder über das Medulla-Netz oder über den „Loop“ von kontralateral in die Lamina herüberziehen, ist nicht zu erkennen. Die Hauptinnervierung in das Neuropil hinein findet indes dorsal statt.

Im linken optischen Lobus (Abb. 3.40, B und Abb. 3.41, B, S. 103) gehen von der antero-median liegenden Seite der Medulla einige (rote) Neuriten aus, die das zweite optische Neuropil auf ihrer anterioren Front umspannen und in die Lamina hineinreichen. In der Lamina knicken sie rechtwinklig nach dorsal oder ventral ab, wo sie noch etwas weiter in der dorsal-ventralen Ausrichtung verlaufen. Ihr Ursprung ist nicht auszumachen.

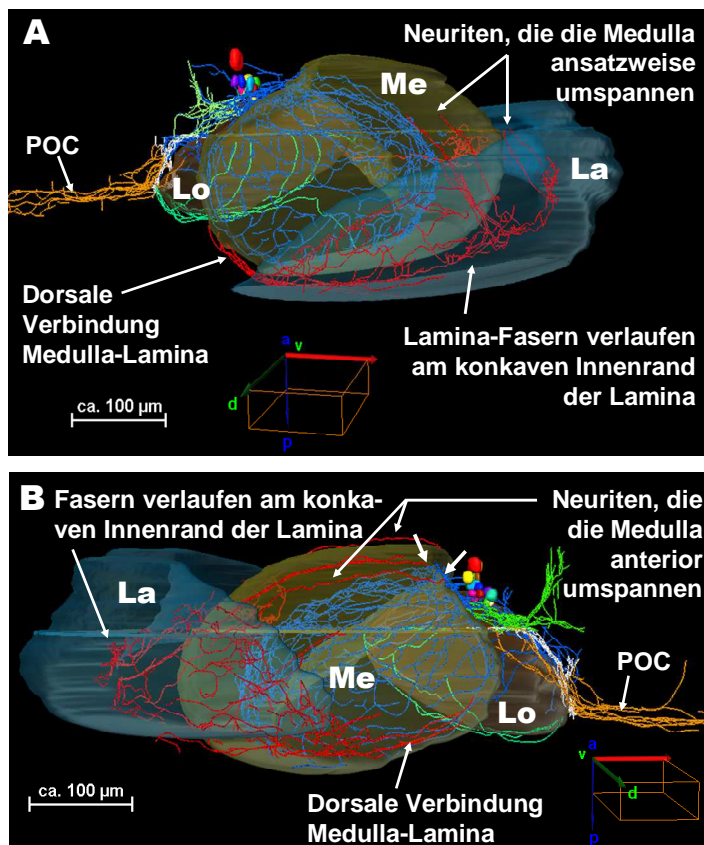


Abb. 3.41: Das PDF-Projektionsmuster in der Lamina im Detail. **A:** Rechte Lamina. **B:** Linke Lamina. Beide von dorsal. Die Fasern orientieren sich am konkaven Innenrand.

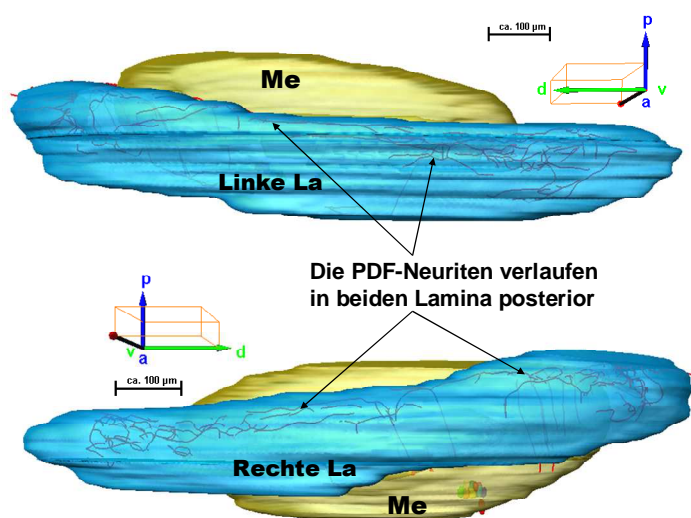


Abb. 3.42: Der posteriore Verlauf der Fasern in der Lamina. Oben linke, unten rechte Lamina. Beide von lateral außen.

Im rechten optischen Lobus erkennt man zwar auch die senkrecht in die Lamina hineinreichenden Fasern (Abb. 3.40, A, unbeschriftet; Abb. 3.41, A, beschriftet), die ebenso vom frontalen Bereich der Medulla herkommen, leider sind diese Fasern im Gegensatz zur linken Hemisphäre nicht weiter gefärbt.

Innerhalb des ersten optischen Neuropils queren die Fortsätze in dorsoanteriorer Ausrichtung nur in bestimmten Schichten. Sie ziehen hauptsächlich am konkaven Innenrand der Lamina entlang. Ausschließlich dorsal ragen mehrere Neuriten nach lateral außen in die dorsale „Ecke“ des Neuropils hinein (Abb. 3.40, A–B, S. 102).

Betrachtet man die Lamina von dorsal (Abb. 3.41), fällt auf, dass die Zellfortsätze am konkaven Innenrand zudem in der eher posterioren Hälfte verlaufen. Die Abb. 3.42 illustriert noch einmal die mehr posteriore Lage der PDF-Neuriten von lateral außen in beiden Gehirnhälften.



### 3.3.4.4 PDF-Neuriten im Protocerebrum

Die PDF-Neurone bilden im ersten Gehirnabschnitt ein weitflächiges, stark verzweigtes Fasergeflecht aus. Die Fortsätze treten von den PDF-Somata kommend an der lateralen Seite des Protocerebrallappens (PL) ein und verteilen sich beinahe im gesamten ipsi- sowie wahrscheinlich auch kontralateralen Protocerebrum (Abb. 3.43). Bei den folgenden Übersichtsbildern (Abb. 3.43 bis Abb. 3.51) sind intensiv geglättete PDF-Neuriten in die Neuropile integriert, um einen übersichtlicheren Verlauf darzustellen. Anders sind bei den Rekonstruktionen mit in Plexen differenzierten Fortsätzen innerhalb des Protocerebrums für eine detaillierte Betrachtung leicht geglättete, dem realen Verlauf etwas näher kommende Fasern eingefügt (Abb. 3.52 bis Abb. 3.62 ab S. 110).

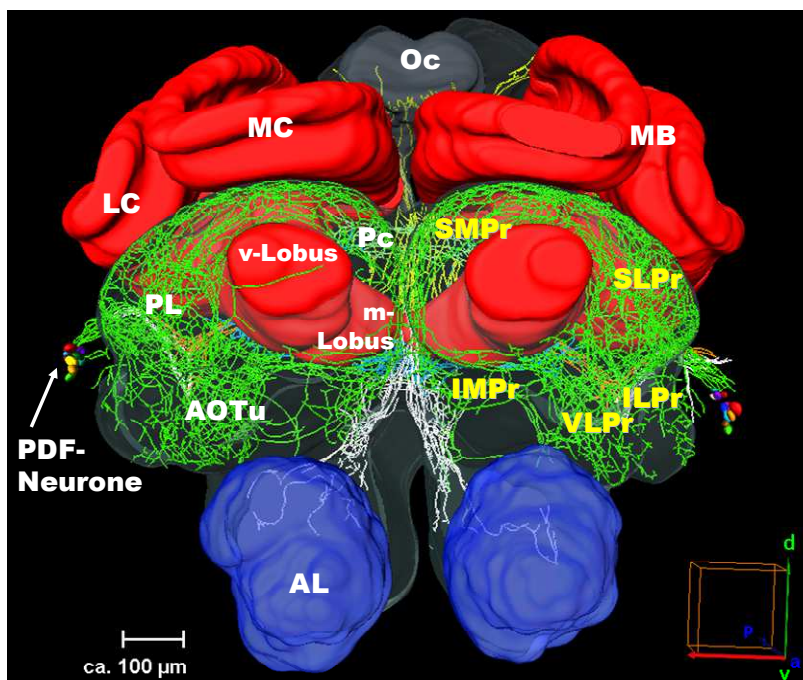


Abb. 3.43: Die PDF-Fasern im Protocerebrum und dessen differenzierte Areale.

Das Protocerebrum (Pc) mit den lateralen PDF-Neuronen, den Pilzkörpern (Mushroom Bodies, MB), den Ozellen (Oc) und den Antennalloben (AL) mit den im Pc enthaltenen PDF-Neuriten von anterior. Die optischen Loben mit ihren Neuriten sind ausgeblendet.

Auf der rechten Bildseite sind die Pc-Areale gelb beschriftet: „superior medial“ und „superior lateral protocerebrum“ (SMPr, SLPr), „inferior medial“ und „inferior lateral protocerebrum“ (IMPr, ILPr) sowie „ventro-lateral protocerebrum“ (VLPr).

Aussagen über die Projektionsrichtungen lassen sich in dem Neuritennetz des Protocerebrums nur eingeschränkt machen, beispielsweise in Bereichen, in denen die Neuriten aus den PDF-Somata heraustreten und ins laterale Protocerebrum oder in die Medulla projizieren, außerdem in solchen, in denen sie in Neuropilen terminieren, wie z. B. den Ozellen oder den Antennalloben. Ansonsten sollten grundsätzlich auch gegenläufige Projektionsrichtungen berücksichtigt werden.

Besonders evident erscheint das PDF-Netz in speziellen Arealen der Protocerebrallappen (Abb. 3.43), explizit im „superior latera“ (SLPr), „inferior latera“ (ILPr) und „ventral lateral protocerebrum“ (VLPr). In die Tiefe reicht es vor allem im ILPr und VLPr. Es zieht anterior zwischen den Calyces der Pilzkörper (Mushroom Bodies, MB) und dem vertikalen Lobus (v-Lobus), also zwischen dem SLPr und dem SMPr („superior medial protocerebrum“), in

lateral-medianer Ausrichtung dorsal der v-Loben entlang. Dabei verläuft es überwiegend nahe der Oberfläche des Protocerebrums (Abb. 3.45, S. 106).

Die PDF-Fasern sind nicht überall im ersten Gehirnabschnitt gleich verteilt. Am dichtesten sind sie im VLPr vertreten (Abb. 3.44). Keine PDF-Neuriten findet man median der v-Loben innerhalb des medialen Protocerebrums (Abb. 3.45, schwarz-weiß gestreifter Pfeil). In der Mitte des frontalen Gehirns beschränken sie sich auf das „*median bundle*“ (Abb. 3.44, schwarz-weiß gestreifte Pfeile), das auf beiden protocerebralen Seiten parallel zur „*median furrow*“ (vgl. Abb. 3.11, A, S. 84) verläuft.

Die PDF-Neuriten, die superior zwischen Calyces und v-Lobus visuell betrachtet in die Mitte konvergieren, ziehen parallel zu beiden Seiten der Rinne in dem erwähnten Bündel entlang, sparen den Bereich zwischen dem v-Lobus und demselben aber aus (schwarz-weiß gestreifte Pfeile jeweils median der v-Loben in Abb. 3.44 bis Abb. 3.46). Sowohl auf der dorsalen als auch ventralen Seite des „*median bundle*“ verzweigen sich die PDF-Fortsätze, weswegen zum einen gegenläufige Projektionen und zum anderen Überkreuzungen kontralateraler Neuriten vermutet werden können (dazu später in Kapitel 3.3.4.5 „Kommissuren“).

Dorsoanterior der „*ventral crotch*“, der „bauchwärts“ liegenden Einschnürung zwischen den protocerebralen Hemisphären und damit dem „unteren“ Ende der „*median furrow*“, divergiert das „*median bundle*“ in beide Antennalloben hinein. Außerdem teilt es sich nach lateral rechts und links ins ventrale Protocerebrum (Abb. 3.47, S. 107, gelbe Richtungspfeile). Laut Mobbs (1985) dehnt es sich ins mediane und superficiale Protocerebrum aus und enthält sowohl auf- als auch absteigende Fasern, deren Wurzeln in mechanosensorischen Neuropilen des Trito- und Deutocerebrums und im Suboesophagealganglion liegen.

Das Neuritennetz verläuft nicht nur dorsal der v-Loben, sondern auch ventral. Es ziehen einige Fasern zwischen dem „*median bundle*“ und dem lateralen Protocerebrum, also dem ILPr und dem IMPr, entlang. Die Fortsätze aus dem IMPr zusammen mit denen aus dem „*median bundle*“ führen unter anderem in die Antennalloben (Abb. 3.47, Details zu den Antennalloben siehe Kapitel 3.3.4.7). Die Anzahl der querenden PDF-Neuriten im ventralen Protocerebrum zwischen ILPr und IMPr ist deutlich geringer als superior.

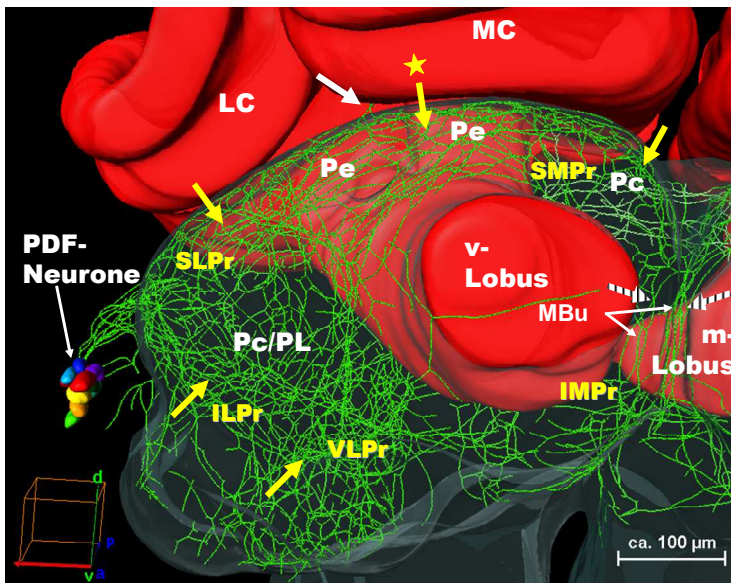


Abb. 3.44: Das PDF-Netzwerk im rechten Protocerebrallappen; von anterior.

Die gelben Pfeile deuten auf das stark verzweigte Netzwerk im lateralen Protocerebrum, zudem auf den Verlauf in lateral-medianer Richtung (gelber Pfeil mit Stern). Die schwarz-weiß gestreiften Pfeile zeigen median auf das „median bundle“. Der weiße Pfeil verweist auf eine Faser, die sich zwischen die Calyces schiebt.

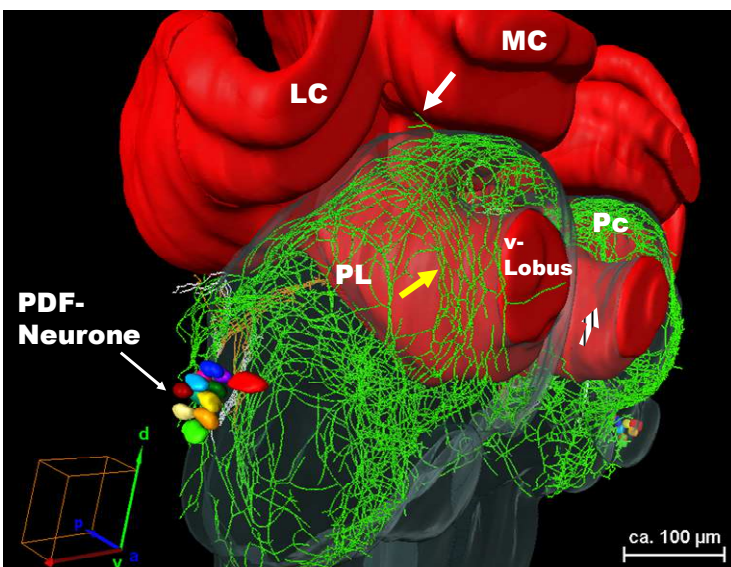


Abb. 3.45: Das PDF-Netzwerk im rechten Protocerebrallappen; von lateral.

Die seitliche Darstellung lässt den oberflächennahen Verlauf der Neuriten erkennen.

Median der v-Loben verlaufen keine Fasern (schwarz-weiß gestreifter Pfeil), diese sind weiter „innen“ zum „median bundle“ zusammengewandert (hier verdeckt, sichtbar in Abb. 3.44). Lateral außen der v-Loben (gelber Pfeil) erstreckt sich ein intensives Netz.

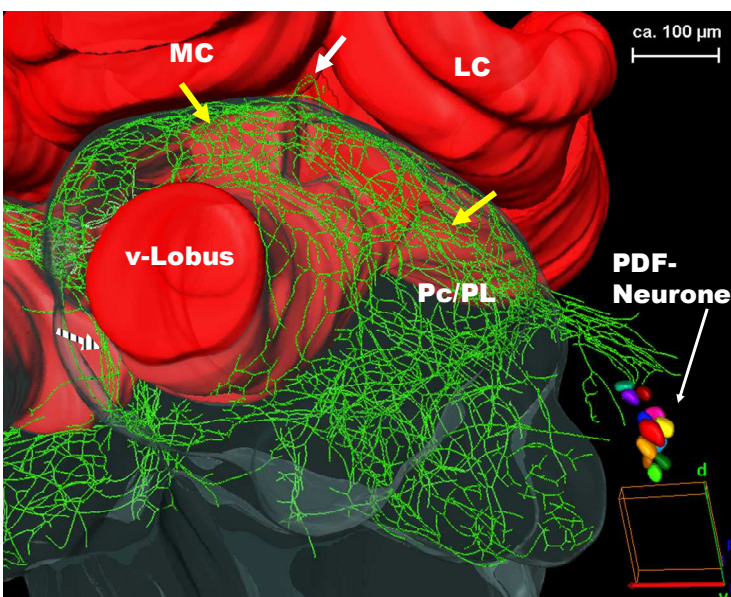


Abb. 3.46: Das PDF-Netzwerk im linken Protocerebrallappen; von anterior.

Der linke Protocerebrallappen von anterior, analog Abb. 3.44. Die gelben Pfeile deuten auf das stark verästelte PDF-Netz, der schwarz-weiße Pfeil markiert das „median bundle“. Der weiße Pfeil weist auf ein paar Fasern hin, die sich zwischen die Calyces des linken Mushroom Bodies schieben.



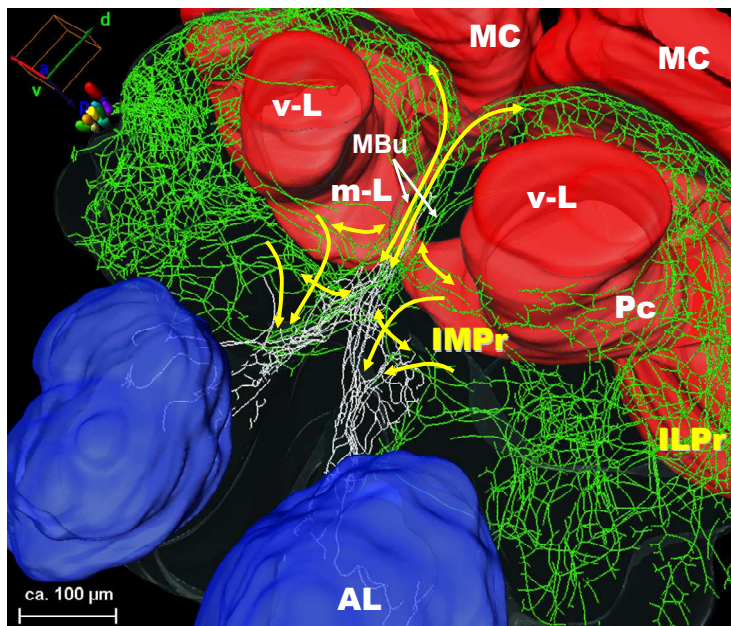


Abb. 3.47: Mögliche PDF-Innervation in die Antennalloben.

Die PDF-Fasern aus dem „median bundle“ (MBu) sowie den ventralen lateralen Protocerebren projizieren in die Antennalloben (AL).

Die gelben, richtungsweisenden Pfeile zeigen mögliche Projektionen an.

Ausgeblendet sind hier wegen der Übersichtlichkeit alle weiter posterior liegenden Faser-Module des Protocerebrums (z. B. „Triangle“, POC, u. a.).

Die Pilzkörper, die mit ihren Stielen dorsal im Protocerebrum stecken, werden von den PDF-Fasern nicht innerviert. Die Neuriten treten nicht in das Neuropil ein, sondern umwandern es anterior und posterior. Von dorsal durch die transparent gestalteten Pilzkörper sehend (Abb. 3.48) erkennt man in der linken Hemisphäre zwei Neuriten, die zwischen dem medianen und lateralen Calyx in anterior-posteriorer Ausrichtung kreuzen (gelber Pfeil in Bild A). In der rechten Hemisphäre existiert nur ansatzweise eine solche Faser, die in die entsprechende Richtung ragt, dann aber abrupt „endet“ (weißer Pfeil mit Stern in Bild B). Auf die Fortsätze, die an der Basis der Calyces zwischen den Pedunculi durchqueren, wird in den Abb. 3.44 bis Abb. 3.46 mit einem weißen Pfeil verwiesen.

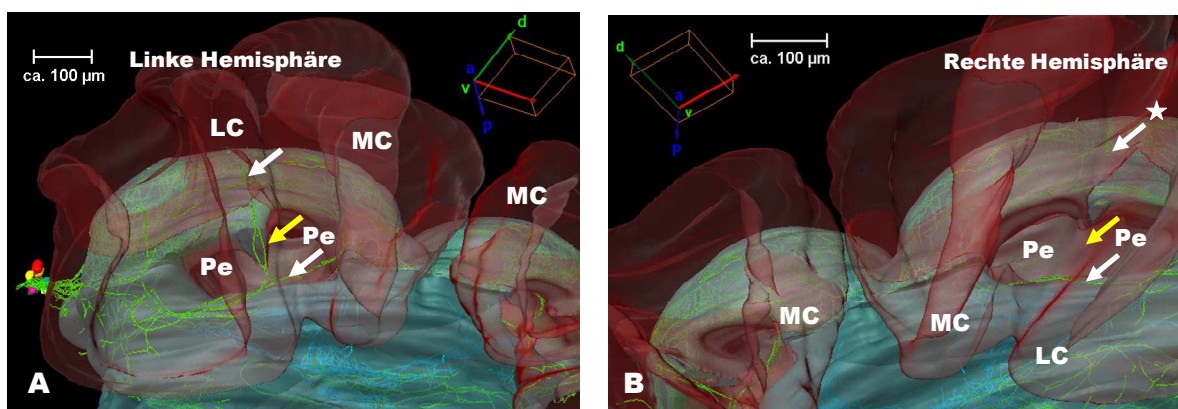


Abb. 3.48: Die PDF-Neuriten dorsal im Protocerebrum zwischen den Calyces.

**A** (linker Pilzkörper): Zwei Fasern ziehen zwischen den Calyces durch (gelber Pfeil), anterior und posterior des Pilzkörpers ziehen ebenfalls Fasern entlang (weiße Pfeile).

**B** (rechter Pilzkörper): Hier existiert nur ein Faseransatz (weißer Pfeil mit Stern), der nicht ganz zwischen den Calyces hindurchzieht. Der gelbe Pfeil weist auf die Stelle hin, an der in der linken Hemisphäre die zwei Fasern entlangziehen, in der rechten Hemisphäre aber fehlen.

Die PDF-Neuriten ziehen im Protocerebrum auch posterior der Pilzkörper entlang, wobei sie in deutlichen Bahnen verlaufen und kein wie teilweise anterior verzweigtes Geflecht

ausbilden (Abb. 3.49 und Abb. 3.50). Das Projektionsmuster erinnert an ein Dreieck, weswegen die Neuriten hier den Terminus „Triangel“ (engl. „triangle“) zugewiesen bekamen (nicht zu verwechseln mit einem ebenfalls als Triangel bezeichneten Bereich bei Kirschner et al. (2006), siehe Kapitel 4.3.4 ab S. 171). Die Seite, die lateral außen posterior des m-Lobus verläuft, erhielt die Bezeichnung „laterale Dreiecksseite“, die anderen Seiten entsprechend ihrer Lage „ventrale“ und „mediane“ Seite (Abb. 3.51, A).

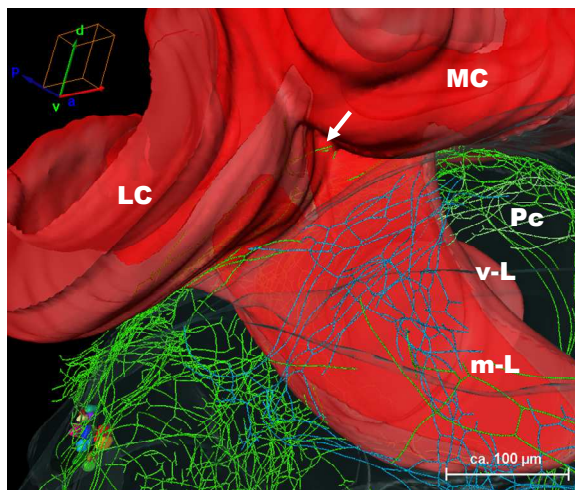


Abb. 3.49: Das „Triangel“ (blau) von posterior hinter dem m-Lobus (m-L). Grün: Fasern des übrigen Protocerebrums. Weißer Pfeil: Faser zwischen den Calyces (vgl. Abb. 3.48).

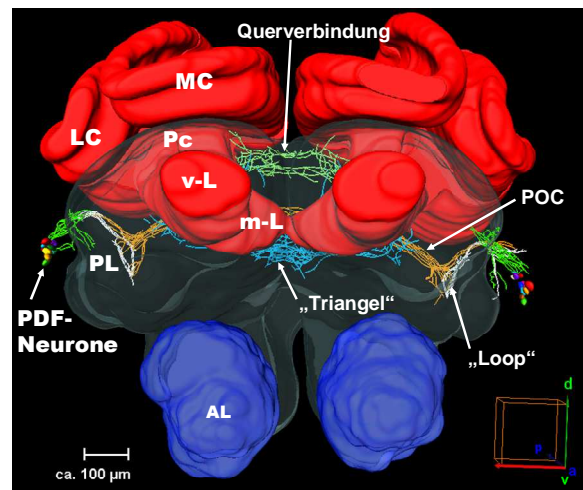


Abb. 3.50: Das „Triangel“ posterior der Pilzkörper (blaue Fasern), von anterior betrachtet.

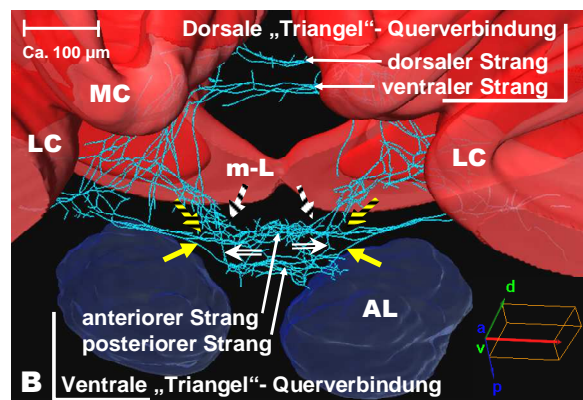
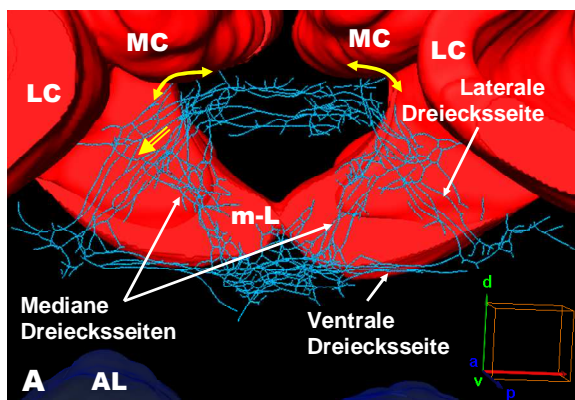


Abb. 3.51: Das „Triangel“ posterior der m-Loben (m-L), von posterior.

**A:** Die Seiten der Dreiecke sind je nach Lage als laterale, ventrale und mediane Dreiecksseiten definiert. Die gelben Pfeile symbolisieren das mehr anteriore Queren des im Bild oberen Stranges. (Gelber Rahmenpfeil: Kreuzungszone auf halbem Weg zwischen parallel laufenden „Bändern“, vgl. Kap. 3.3.4.5.)

**B:** Ein leichtes Kippen des Bildes A offenbart, dass es sich bei den Querverbindungen um jeweils zwei Streben, eine dorsale und ventrale bzw. eine anteriore und posteriore handelt.

Gelbe Pfeile: Verbindung ventral-posteriorer Strang mit ventraler „Triangel“-Seite.

Weißer Rahmenpfeil: Verbindung ventral-posteriorer Strang mit medianer „Triangel“-Seite.

Gelb-schwarz quer gestreifte Pfeile: Übergang ventrale „Triangel“-Seite in ventral-anterioren Strang.

Weiß-schwarz schräg gestreifte Pfeile: Übergang mediane „Triangel“-Seite in ventral-anterioren Strang.

Alle Projektionen sind bildhaft beschrieben, keine Rückschlüsse auf Verlaufsrichtungen.

Dorsal und ventral sind die beiden Dreiecke bzw. Hemisphären durch Kommissuren miteinander verbunden (Abb. 3.51, A). Eine etwas nach anterior gekippte Ansicht (B) gibt

zu erkennen, dass es sich jeweils um zwei Stränge handelt – einen mehr dorsal bzw. anterior und einen mehr ventral bzw. posterior liegenden. Vermutlich verlaufen diese Bahnen in diversen Kommissuren (3.3.4.5 „Kommissuren“, S. 118).

In Anlehnung an das PDF-Netzwerk im Gehirn der Schabe *Leucophaea maderae* (Wei et al., 2010) wurde versucht, auch in dem der Honigbiene diverse Kommissuren und Plexen zu identifizieren (ab Abb. 3.52ff, S. 110). Da die Färbung beinahe ausschließlich in Variositäten vorherrscht und ein differenziertes Verfolgen einzelner Neuriten über größere Entfernungen kaum möglich war, sind die Projektionen und die Einteilung nach Plexen sehr interpretationsabhängig. Die Farbzuteilung zu diversen Plexen bezieht sich nicht auf Axone, die von einem Soma ausgehen und in eine bestimmte Richtung verfolgbar sind. Vielmehr wurden im Nachhinein nach Augenmaß Areale ausgewählt, die ungefähr zusammengehören könnten.

Einige Ähnlichkeiten scheinen bei den beiden Tieren zu bestehen. So weitet sich, bildlich gesehen, von den PDF-Somata kommend nach anterior ein Geflecht aus, das dem im Gehirn der Schabe vergleichbar ist. In diesem gabelt sich der LVT (*lobula valley tract*), der Fasern in gebündelter Form sowohl von ipsi- als auch kontralateralen Medulla-PDF-Neuronen führt, von der akzessorischen Medulla kommend in die AOC (*anterior optic commissure*) und die POC (*posterior optic commissure*) (Abb. 1.7, S. 17). Von der AOC zweigen zahlreiche Plexen ab (und/oder ziehen in sie hinein), z. B. nach anterolateral der weitläufige „*anterior fiber plexus*“ (AFP), der mit einem weiteren Plexus im „*inferior lateral*“ und „*ventro-lateral protocerebrum*“ (ILPr und VLPr) verbunden ist (Wei et al., 2010). Auch wenn in diesem Bienehirn keine eindeutige, PDF-führende AOC sowie kein LVT identifiziert werden konnten, so gleichen sich doch einige Projektionsmuster. Entsprechend dem Schaben-AFP wurde dem im Bienehirn an übereinstimmender Stelle befindlichen Projektionswerk die Bezeichnung „*anterolateral fiber plexus*“ (ALFP) gegeben (der Zusatz „lateral“ drückt die seitlichere Lage aus). Diesem Plexus wurde die Farbe Rot zugewiesen (Abb. 3.53, S. 111).

Der ALFP erstreckt sich im Gehirn der Honigbiene wie auch in dem der Schabe superficial (Abb. 3.53) und spart ein rundes Feld lateral am SLPr-Rand aus (Abb. 3.52, S. 110). Eine einzelne Faser aus dem ALFP terminiert mit einem kleinen Verzweigungsareal ganz lateral außen im ILPr (Abb. 3.52, roter Pfeil mit Sternchen), dessen Höcker auch als laterales Horn bezeichnet wird. Eine Art Band aus einigen sich verzweigenden Neuriten verbindet anterior und superficial verlaufend den ALFP mit dem IMPr (gleiche Abbildung und Abb. 3.54, S. 111, die zwei rot-grünen, senkrecht gestreiften Pfeile mit Sternchen).



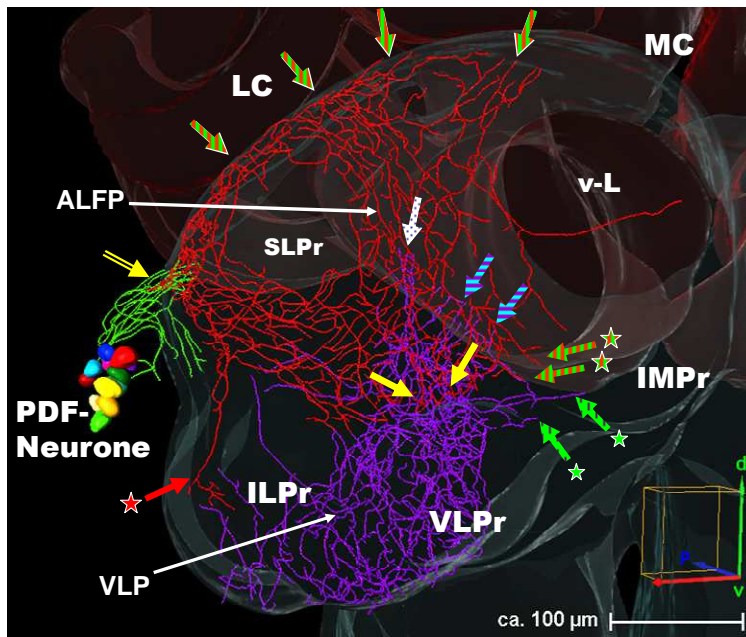


Abb. 3.52: Das differenzierte protocerebrale PDF-Netzwerk. Rechter Protocerebrallappen (PL) von anterolateral. Eingebildet sind der superficiale „anterolateral fiber plexus“ (ALFP, rot) und der tiefer ins Neuropil reichende „ventrolateral plexus“ (VLP, lila) im „ventrolateral protocerebrum“ (VLPr).

**Gelbe Pfeile:** Lateraler Rahmenpfeil zeigt Kontakte zwischen dem ALFP und den Fasern aus den PDF-Somata; gelbe Pfeile anterior markieren den Übergang zwischen dem ALFP und dem VLP.

**Rot-grüne, senkrecht gestreifte Pfeile** markieren über die ganze dorsale Länge des ALFP Kontakte zu den hier ausgeblendeten Fasern im dorsalen PL sowie gleiche Pfeile mit Stern die Verbindungspunkte zu den ins IMPr querenden, ebenfalls ausgeblendeten Fasern (beide eingebildet in Abb. 3.54, grüne Fasern).

**Roter Pfeil mit Stern:** Eine ALFP-Faser terminiert im lateralen ILPr.

Der **blau-weiß gepunktete Pfeil** markiert den Übergang des VLP mit dem Trakt, der im Ringneuropil dorsal um den v-Lobus herumläuft (eingebildet z. B. in Abb. 3.54, dunkelblaue Fasern).

**Hellblau-lila, quer gestreifte Pfeile:** Fortsetzung des VLP mit der posterior des m-Lobus verlaufenden lateralen „Triangel“-Seite (eingebildet in Abb. 3.57, hellblaue Fasern).

**Grüne, senkrecht gestrichelte Pfeile mit Stern:** Diese Fasern aus dem VLP terminieren hier.

Dagegen dringt der lila visualisierte VL-Plexus im ILPr und im VLPr in das Innere des Neuropils ein. Verbunden sind der VLP und der ALFP anterior, lateral des v-Lobus; beide gehen in einer breiteren Zone ineinander über (gelbe Pfeile in Abb. 3.52 und Abb. 3.53, S. 111). Der VLP reicht mit mehreren Fasern in das ILPr, konzentriert sich aber mit seinen dichten Verzweigungen vor allem im VLPr, wo er bis in eine Tiefe von etwa 175 µm vordringt (gemessen von der frontalen, anterioren Oberfläche). Dieses Phänomen bestätigt sich in der linken Hemisphäre.

Das PDF-Netz im VLPr ist mit dem „median bundle“ über einen dorsal um den v-Lobus verlaufenden Strang verbunden (Abb. 3.52 bis Abb. 3.55, blau-weiß gepunkteter Pfeil bzw. dunkelblaues Faserbündel). Der Strang beginnt

beim Übergang vom VLP in etwa 80 µm Tiefe, tritt in das den v-Lobus umgebende Ringneuropil (siehe 2-D-Aufnahmen Abb. 3.62, F und H, S. 117/118) in ungefähr 105 µm Tiefe ein, begleitet es dorsal um den v-Lobus und wendet sich nach ventral in das „median bundle“ in einer Tiefe von etwa 145 µm, wo es aufgrund der einschneidenden „median furrow“ wieder superficial verläuft. Auf diesem Weg gibt es im Wesentlichen drei Kreuzungsgebiete, in denen es Kontakte mit dorsal querenden Strukturen sowie median mit Kommissuren hat (gelb nummerierte Pfeile in Abb. 3.55 und Abb. 3.57 ab S. 111).

(Weiter auf S. 113.)

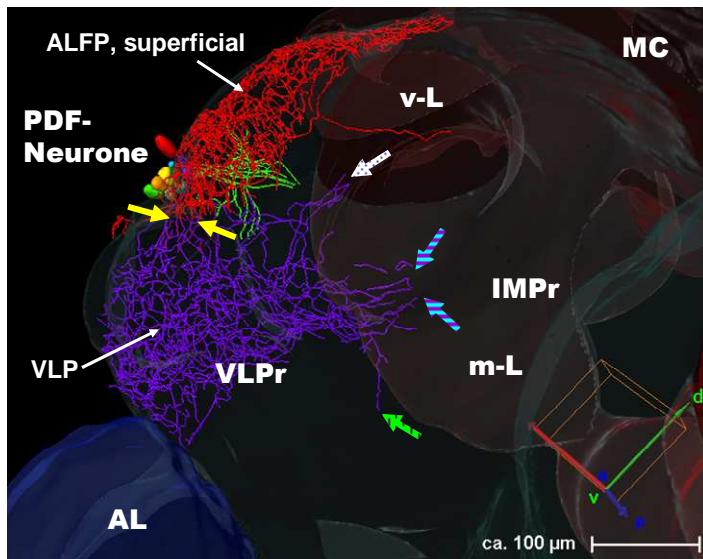


Abb. 3.53: Der superficiale ALFP, Ansicht von ventromedian.

Die schiefe Ansicht bestätigt den superficialen Verlauf des ALFP und das Eindringen des VLP ins Neuropil. Die Farbwahl der Pfeile entspricht der in Abb. 3.52.

Der **grün gestrichelte Pfeil** deutet auf eine Faser, die auf Höhe der Verbindung zum „Triangel“ nach posterior ins posteriore Protocerebrum zieht und sich dort fortsetzt (ausgeblendet, da wegen Unübersichtlichkeit nicht darstellbar).

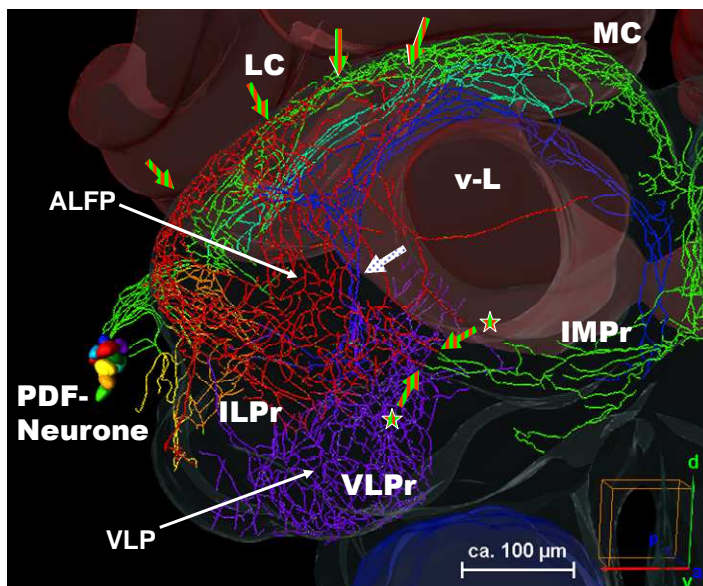


Abb. 3.54: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, anterior.

Es ist beinahe das gesamte PDF-Netzwerk des anterioren PLs differenziert visualisiert, ausgeblendet sind die Kommissuren und die Neuriten, die in den Antennallobus projizieren. Farbgebung und Beschriftung wie in Abb. 3.52.

**Dunkelblau** sind die Fasern, die dorsal um den v-Lobus im Ringneuropil verlaufen.

Das **türkisblaue Band** liegt quer verlaufend zwischen dorsaler grüner Umspannung und dem dunkelblauen Ringneuropil (Details siehe z. B. Abb. 3.57).

**Rot-grüne, senkrecht gestreifte Pfeile mit Stern** zeigen auf Verbindungsfasern zwischen VLPPr und IMPr.

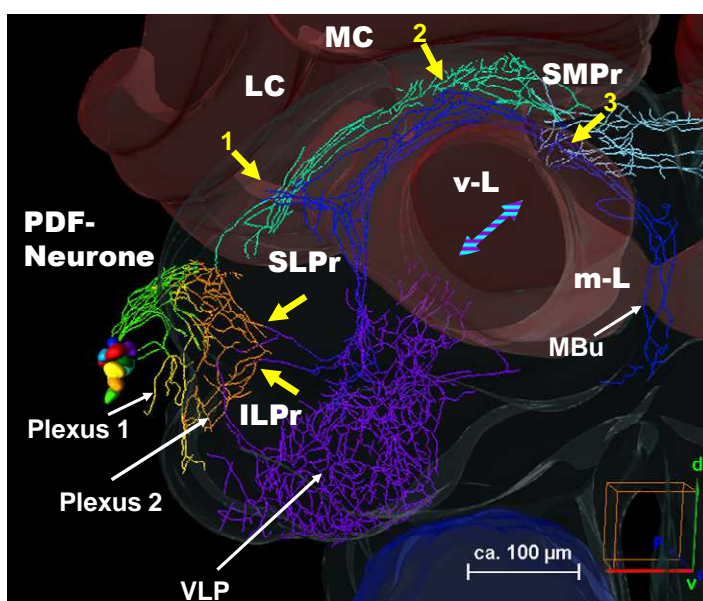


Abb. 3.55: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL ohne ALFP, anterior.

Plexus 1 (**gelb**) und 2 (**orange**) scheinen getrennt voneinander lateral zu enden. Plexus 1 terminiert teilweise außerhalb des Protocerebrums. Plexus 2 zeigt schon vor dem Terminationsgebiet Kontakte (**gelbe Pfeile**) zum VLP (**lila**). Der weiter innen liegende, **dunkelblaue Strang** läuft dorsal um den v-Lobus und setzt sich median ins „median bundle“ (MBu) fort. Der **hellblaue, quer gestreifte Doppelpfeil** symbolisiert den Verlauf eines „Triangel“-Schenkels posterior des m-Lobus. **Gelbe, nummerierte Pfeile** zeigen auf die Übergänge von PDF-Fasern im Ringneuropil mit anderen Fasern. **Hellblaue Kommissuren** im medianen Protocerebrum stellen die dorsale Doppelkommissur dar.



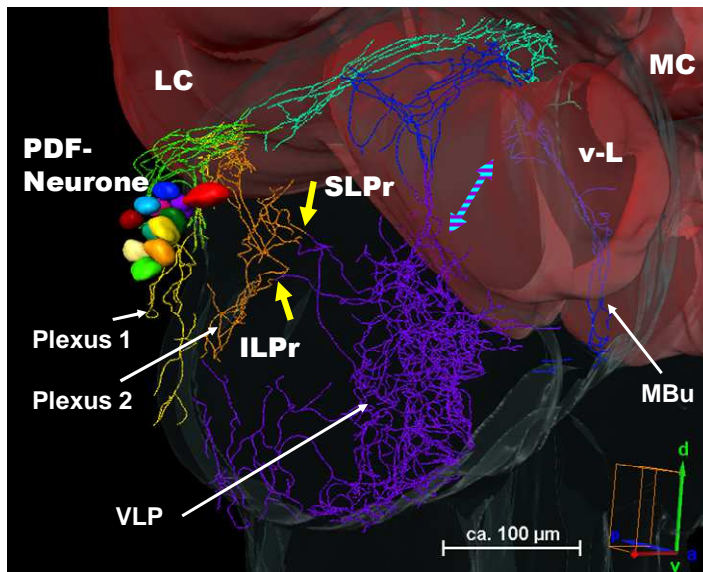


Abb. 3.56: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL mit seitlichen Plexen und VLP, anterolateral.

Drei Fasern verbinden den Plexus 2 und den VLP (**gelbe Pfeile**). Der **hellblau-lila, quer gestreifte Doppelpfeil** symbolisiert den Verlauf der Fasern der lateralen „Triangel“-Seite.

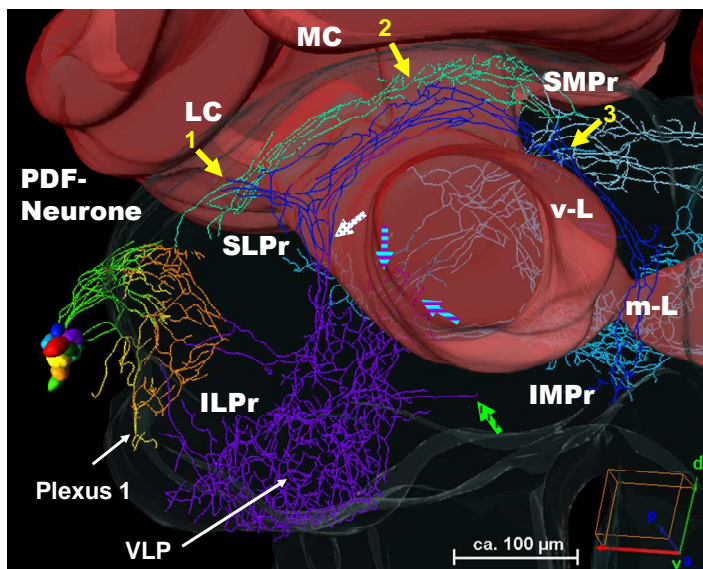


Abb. 3.57: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL ohne ALFP, anterior.

Das „Triangel“ verläuft posterior und schimmert durch den v-Lobus durch, die **waagerecht gestreiften, blau-lila farbigen Pfeile** (wie in Abb. 3.52) zeigen die Kontaktbereiche mit dem VLP. Die **gelben Pfeile** verdeutlichen die Übergänge zwischen den PDF-Fasern im Ringneuropil und etwas weiter posterior verlaufenden Kommissuren (**türkisblauer Trakt**, siehe unten im Text). Der **grün gestrichelte Pfeil** zeigt auf den Übergang ins posteriore Pc, beschränkt auf eine Faser (nicht darstellbar).

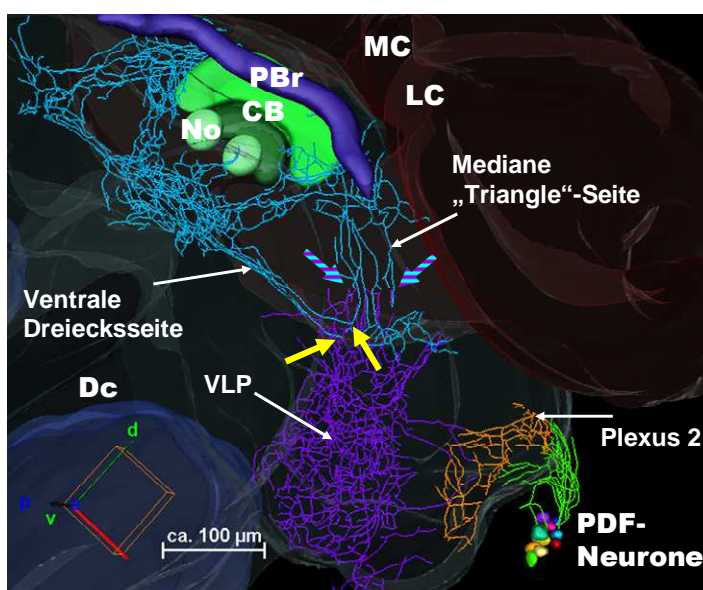


Abb. 3.58: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, posterior.

Der VLP und die ventrale (**gelbe Pfeile**) sowie mediane Dreiecksseite (**hellblau-lila, quergestreifte Pfeile**) des „Triangels“ gehen ineinander über.

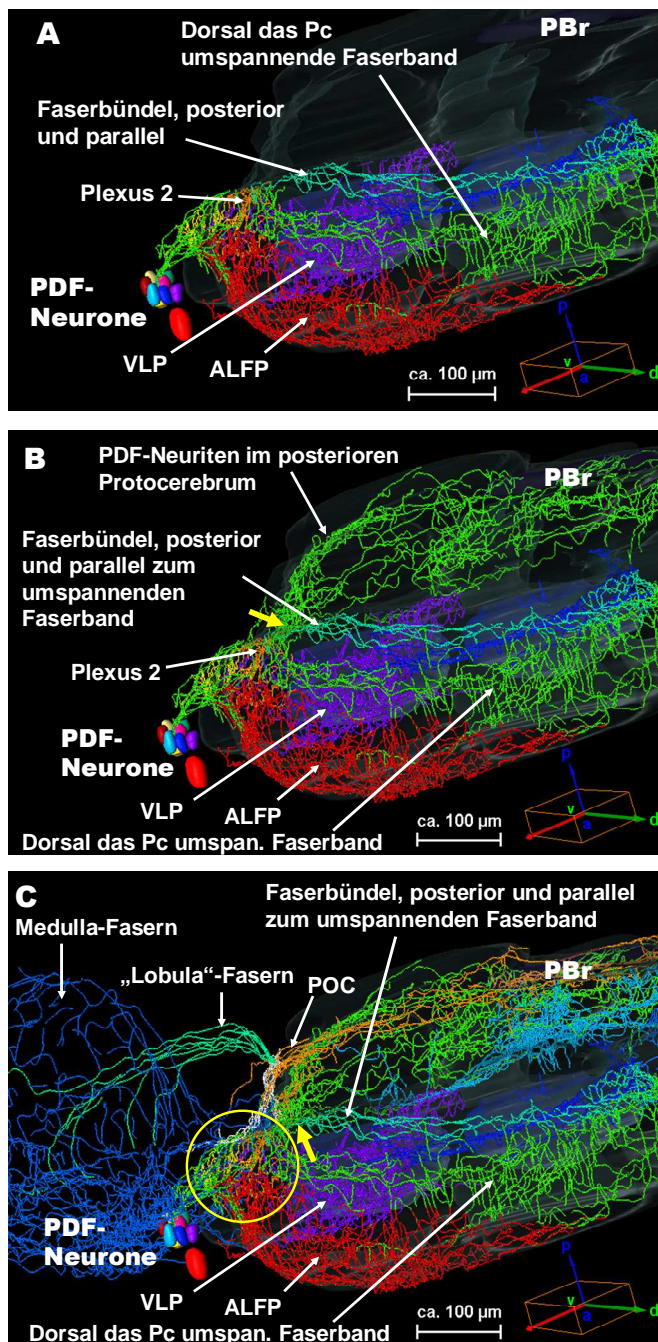


Abb. 3.59: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, von dorsal.

**Gelber Pfeil:** Übergang zwischen Fasern im posterioren Pc-Bereich und dem türkisblau visualisierten Bündel, das dorsal den mittleren und lateralen Bereich quer verbindet. In **Bild A** sind die posterioren Strukturen ausgeblendet. Das türkisblaue Bündel verlängert sich ins posteriore Pc (**Ausschnitt B**) und ist vermutlich mit Plexus 2 sowie 1 (hier nicht sichtbar) und den PDF-Zellen verknüpft. In **C** sind zur Verdeutlichung der Farbzuteilungs-Problematik (**Kreis**) die POC, das „Triangel“ und die Fasern im optischen Lobus eingeblendet.

umspannt. Lateral münden die PDF-Neuriten, die von den PDF-Somata kommen, zusammen mit zwei Plexen ins Protocerebrum und sind anfangs in das Band integriert.

Das PDF-Netz im VLPr ist außerdem über ein breites Faserband mit der lateralen Seite des „Triangels“ verbunden, das posterior hinter dem m-Lobus passiert (ab S. 110, Abb. 3.52, Abb. 3.53 und Abb. 3.55 bis Abb. 3.57: hellblau-lila gestreifte Pfeile; Doppelpfeile deuten an, wo das ausgeblendete „Triangel“ folgen würde). Der in der Rekonstruktion bestehende Übergang liegt bei dieser Biene in einer Tiefe von etwa 180 µm. Auf zwei bis vier Fasern beschränkt besteht an gleicher Stelle ein Übergang mit der ventralen Seite des „Triangels“ (Abb. 3.58, S. 112). Der VLP durchsetzt das VLPr und setzt sich, visuell betrachtet, ins posteriore Protocerebrum fort (keine Abbildung). Das gesamte „Triangel“ umfasst zwischen anterior und posterior eine Dicke von etwa 115 µm und reicht bis in eine Tiefe von etwa 295 µm.

Die differenzierte Darstellung des PDF-Netzes im Protocerebrum verdeutlicht, dass die Fasern dorsal zwischen lateral und median in, in sich vielfach verzweigenden, aber tendenziell quer ausgerichteten „Bändern“ verlaufen. So gibt es ein superficial orientiertes Band aus vernetzten Fasern, das den äußersten dorsalen Rand des Protocerebrums

Nach anterior, visuell betrachtet, erweitert es sich in den ALFP. In der Mitte des Gehirns erstreckt es sich der Einkerbung der „*median furrow*“ folgend nach ventral und geht ins „*median bundle*“ über (dorsale, grüne Fasern in Abb. 3.54, S. 111), wobei es gleichzeitig als deutliche Kommissur mit dem spiegelbildlichen „Band“ in der linken Hemisphäre verbunden ist (Abb. 3.62, G, H, S. 117/118).

Parallel zu der Umspannung des dorsalen Protocerebrums (grün in Abb. 3.54) passiert ein weiteres Bündel (türkisblau) den vordersten Gehirnabschnitt. Es verläuft weiter posterior und eine Nuance mehr innerhalb des Neuropils zwischen dem dorsalen Außenband (grün) und dem im Ringneuropil lokalisierten Strang (dunkelblau, Abb. 3.54). Ganz lateral außen kann dieses Bündel wegen der hohen Dichte an Fortsätzen nicht zugeordnet werden, daher ist die Farbzweisung abgebrochen. In diesem Bereich befinden sich Fasern, die zu dem dorsal umspannenden „Band“ und dem ALFP gruppiert wurden. Eine eindeutige Zuteilung ist vor allem an der lateralen „Ecke“ des Protocerebrallappens, wo die Neuriten aus den PDF-Zellen ins Protocerebrum ziehen, die Plexen 1 und 2 verlaufen und der ALFP vermutlich seinen Ursprung hat, kritisch. Der Kreis in Abb. 3.59, Bild C, S. 113, verdeutlicht die Problematik.

Median im Protocerebrallappen ist das türkisblaue Faserbündel über eine Kreuzungszone mit dem dunkelblau visualisierten Strang des Neuropilrings (S. 111, Abb. 3.55, gelber Pfeil Nr. 2) und dem grün gezeichneten dorsalen Band (grün eingeblendet in Abb. 3.54, unbeschriftet, ebenfalls S. 111) vernetzt. Im SLPr lateral des v-Lobus zweigt ein deutlicher Strang vom dunkelblauen Ringneuropil ab und führt – bildlich betrachtet – zu dem türkisblauen Bündel (Abb. 3.55, gelber Pfeil Nr. 1). Pro Hemisphäre befindet sich median des v-Lobus ein intensives Kreuzungsareal (gelber Pfeil Nr. 3), in dem die PDF-Fasern aus sämtlichen Richtungen zusammenführen. Dieses ist über Kommissuren mit dem in der anderen Hemisphäre identischen Areal verbunden. Da eine Zuordnung der PDF-Kommissuren zu den in der Literatur beschriebenen allgemeinen Kommissuren der Biene (Mobbs, 1985; Hertel, 1987a; b) oftmals nicht eindeutig möglich war, erhielt die Kommissur in den Abbildungen vorerst die Bezeichnung „dorsale Querverbindung“ (in Abb. 3.55 hellblaue, die Gehirnmitte querende kommissurale Fasern). In der Mitte zwischen den beiden Hemisphären gibt es mehrere PDF-Querverbindungen, die detailliert in Kapitel 3.3.4.5 „Kommissuren“ behandelt werden.

Ein auf eine Faser reduzierter Übergang vom VLP besteht ins posteriore Protocerebrum (Abb. 3.53 und Abb. 3.57: grüner, gestrichelter Pfeil).

Lateral außen in den Protocerebrallappen existieren zwei kleinere Plexen (Abb. 3.55, Plexus 1 und 2). Beide enden in den Zeichnungen blind. Der kleinere Plexus 1 (gelbe Fasern) zieht anscheinend von den Somata aus zuerst in den PL (in der Abbildung noch grün dargestellt), dann nach ventral, wo er sich nach lateral außen orientiert und das Protocerebrum ein Stückchen verlässt. Dabei könnte es sich allerdings um ein Zeichnungsartefakt handeln, das durch das Glätten der Neuropile entstanden ist. Der Plexus 2 projiziert gleichfalls nach lateral außen, verlässt aber das Pc nicht und geht mit Verzweigungen in den VLP über. Eventuell könnte/n die das VLPr innervierende/n Faser/n zwischen dem Plexus 2 hindurchziehen und sich schließlich im VLPr verzweigen (Abb. 3.56). In der linken Hemisphäre, deren PDF-Netzwerk undifferenziert belassen wurde, fallen die Plexen 1 und 2 ebenfalls als am lateralen Rand des PLs und in den lateralen Rand des ILPr strebende Fasern auf (Abb. 3.43, S. 104).

Ein weiterer Plexus (Plexus 3) erstreckt sich nach dorsoposterior (Abb. 3.60, S. 116, pinke Fasern). Das Kreuzungsgebiet für alle Plexen im PL liegt vermutlich lateral außen, dorsal der PDF-Somata, von denen die Fasern stammen. Aus dieser Ecke entfernen sich beinahe alle Fasern in diverse Richtungen. In dem Areal ist, wie schon mehrfach betont, ein differenziertes Klassifizieren einzelner Projektionen nicht möglich und deshalb auch keine eindeutige Farbzuordnung erfolgt. Es scheint aber, dass der Plexus 1 und 2 hier herausprojizieren. Auch der Plexus 3 könnte dort seinen Ursprung haben, allerdings besitzt er noch eine breitere Übergangszone, in der er mit dem anterior der Pedunculi ziehenden türkisblau visualisierten Faserbündel verknüpft ist (weißer Pfeil). Somit wäre auch eine Herkunft aus anderen Richtungen denkbar. Der Plexus 3 terminiert dorsoposterior der Pilzkörper.

Eine Faser scheint sich aus dem lateralen Kreuzungsareal in den posterioren Bereich des Protocerebrums zu verästeln (grünes Netzwerk posterior des gelben Pfeils in Abb. 3.60). Auch/und eine umgekehrte Projektion wäre denkbar, da posterior mittig vereinzelt kommissurale Fasern existieren (keine Abbildung).

Das PDF-Netz passiert zwischen dem ILPr/VLPr und dem medianen Protocerebrum mit vergleichsweise wenigen Fasern (S. 111, Abb. 3.54, rot-grüne, senkrecht gestreifte Pfeile zeigen den Übergang zwischen VLP und den grünen Fasern, die zum IMPr ziehen). Erst im LAL („*lateral accessory lobe*“, Lobus ventromedian des IMPr, S. 117/118, Abb. 3.62, H) sind wieder mehrere Verzweigungen präsent, die sich einerseits in den Antennallobus fortsetzen, andererseits aus dem „*median bundle*“ herziehen (oder umgekehrt).



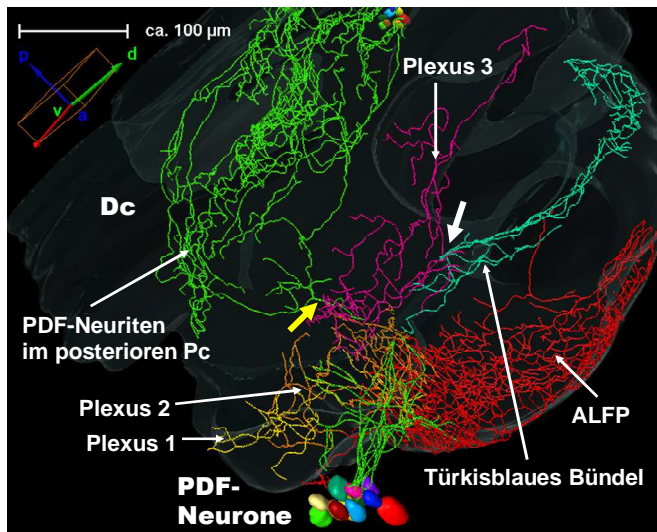


Abb. 3.60: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL mit posteriorer Projektion, dorsal. Eine einzelne Faser scheint nach ganz posterior in den PL zu projizieren (grün im posterioren Bereich). Nach dorsoposterior (posterior der Pilzkörper) zieht der Plexus 3 (pink).

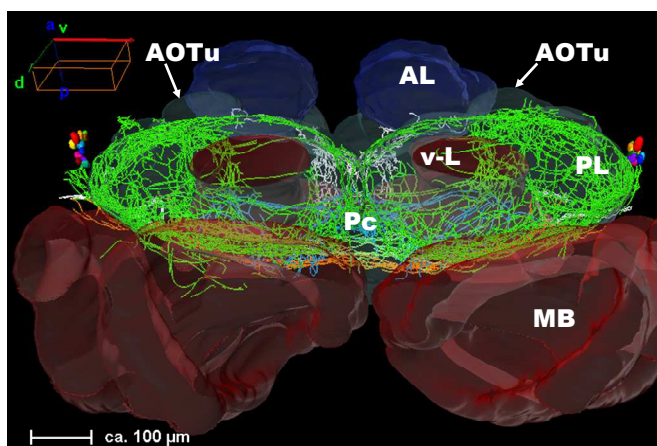
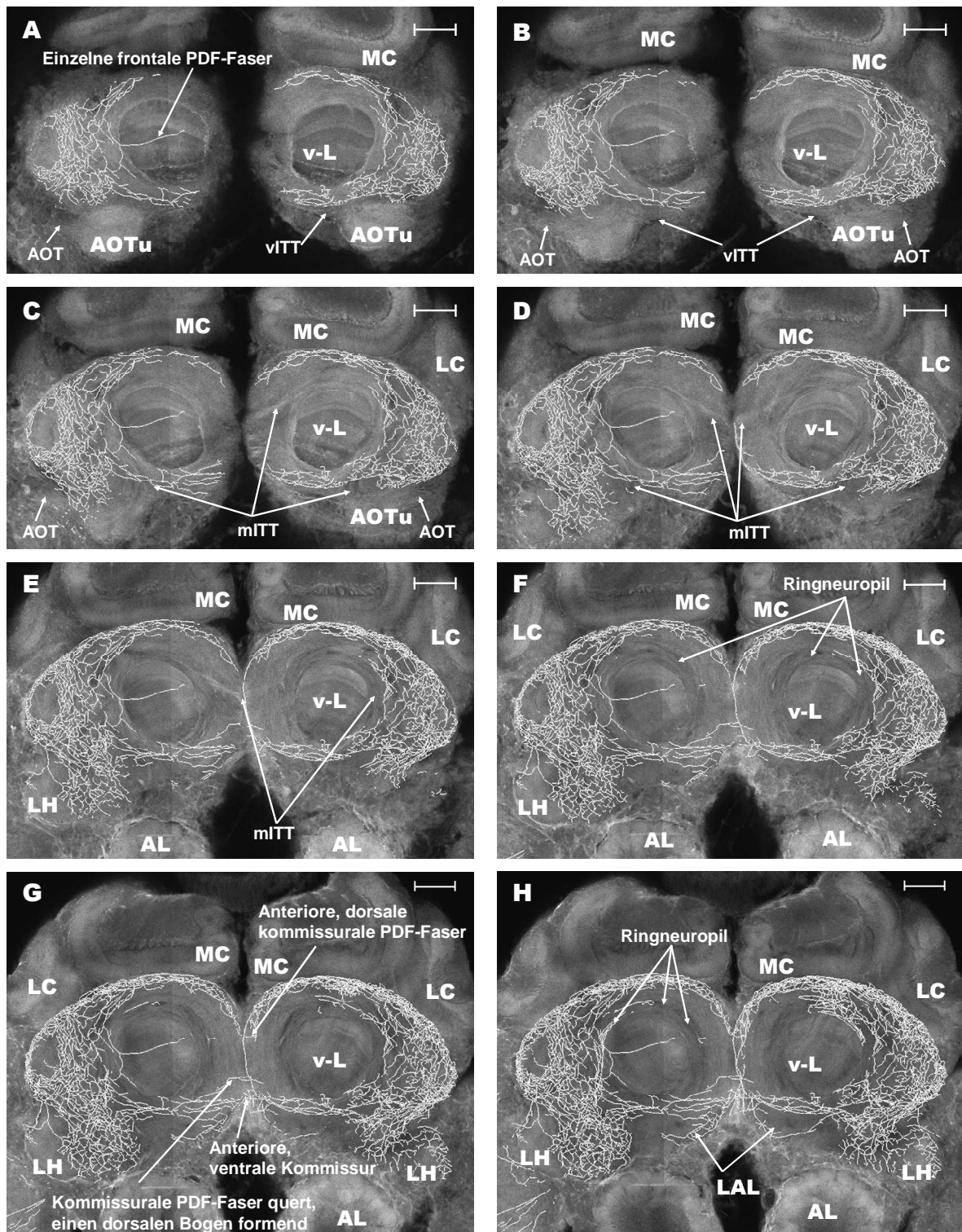


Abb. 3.61: Die anterioren optischen Tuberkel (AOTu), von dorsal. Die PDF-Fasern passieren unter der Struktur hindurch und innervieren sie nicht.

Eine Struktur, in der sich keine PDF-Fasern befinden, ist das frontal aus dem Protocerebrum herausragende anteriore optische Tuberkel (AOTu). Es wird von den Neuriten ausgespart, wie die Ansicht von dorsal über die frontale Seite des Gehirns entlang zeigt (Abb. 3.61). In den Folgebildern der Abb. 3.62 (S. 117/118) sind in die konfokalen 2-D-Aufnahmen die 3-D-Rekonstruktionen der PDF-Neuriten eingefügt. Die Bildabfolge verdeutlicht zwischen A und E für die rechte Hemisphäre (links im Bild) sowie zwischen A und G für die linke Hemisphäre (rechts im Bild), dass die PDF-Neuriten unter dem AOTu hindurchziehen. Allgemein sind nach Mota et al. (2011) mit dem AOTu vier Trakte assoziiert: zunächst der AOT („*anteriore optic tract*“, nach Mobbs (1985) „*anteriore optic tubercle tract*“ (a.o.t.t.)), der die Informationen von der ipsilateralen Medulla und Lobula von lateral kommend ins AOTu übermittelt

(Bilder A–C); als nächstes der „*ventral inter-tubercle tract*“ (vITT, Bilder A–B), der median beider AOTus direkte Verbindung schafft, sowie der „*medial inter-tubercle tract*“ (mITT, Bilder B–D), der lateral um die v-Loben ziehend und mittig als Kommissur V-artig die protocerebralen Hemisphären und schließlich die kontralateralen AOTus miteinander verbindet (Mobbs spricht nur von einem i.t.t.); zuletzt der „*tubercle-accessory lobe tract*“ (TALT, ohne Abbildung), der analog zum mITT lateral um den ipsilateralen v-Lobus herumzieht, dann ipsilateral bleibend nach ventral läuft und im lateralen akzessorischen Lobus (LAL) terminiert und so die AOTus mit dem medianen Protocerebrum verknüpft. Die Abb. 3.62 verdeutlicht, dass die PDF-Fasern in keinem Trakt integriert sind. Im Ringneuropil verlaufen sie zwar ebenfalls, jedoch in einer anderen Tiefe.

Ganz anterior erstreckt sich in der rechten Hemisphäre eine PDF-Faser über die anteriore Oberfläche des v-Lobus (Bild A).



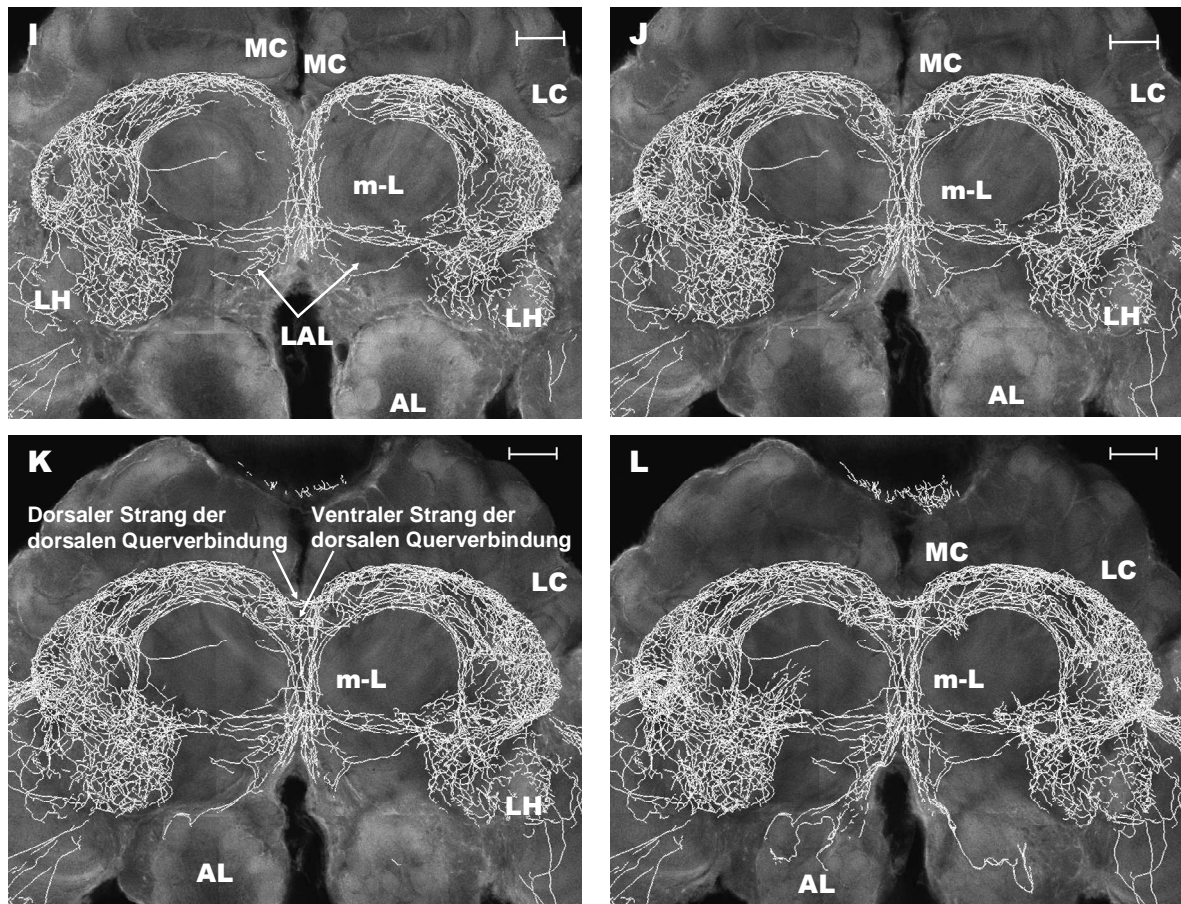


Abb. 3.62: Die mikroskopischen Aufnahmen als Hintergrund überlagert mit den dreidimensional rekonstruierten PDF-Neuriten in der oberen Hälfte des Bienengehirns. Von anterior nach posterior (von A nach L) beträgt der Abstand zwischen zwei Bildern je etwa 15  $\mu\text{m}$ . Zu beachten ist, dass der Hintergrund nur jeweils eine Ebene präsentiert, wohingegen alle 3-D-Neuriten, die sich anterior dieser Schnittebene befinden, in der Ansicht erhalten bleiben. Messbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.4.5 Kommissuren

In diesem Kapitel sind alle PDF-Kommissuren, die in dem untersuchten Honigbienen-gehirn gefärbt wurden, aufgeführt.

Ganz **anterior** auf der **dorsalen** Seite der „*median furrow*“, in einer Tiefe von etwa 110 bis 130  $\mu\text{m}$  (gerechnet von der frontalen Oberfläche), überbrücken einzelne PDF-Neuriten die Mitte des Gehirns (Abb. 3.62, G, H, davon in G beschriftet). Sie verbinden die Faser-geflechte miteinander, die die dorsalen Protocerebrallappen umspannen (grün visualisiert in Abb. 3.54, S. 111). Wegen der Einkerbung quert die Kommissur direkt unter der Oberfläche der „*median furrow*“, genauso wie die folgende Kommissur.

Ebenfalls **anterior** ungefähr zwischen 85 und 130  $\mu\text{m}$  Tiefe, jedoch auf der **ventralen** Seite der „*median furrow*“, passieren mehrere Fasern die Gehirnmitte. Die enthaltenen Fortsätze entstammen vermutlich einerseits dem „*median bundle*“ bzw. ziehen in es hinein, andererseits den anteroventral querenden Fasern, die aus den ALF-Plexen (vgl.



Abb. 3.54, S. 111) herführen bzw. in sie hineinziehen. Eine dieser Fasern wendet sich nach dorsal und quert dort die Mitte (Abb. 3.62, E–G, in G beschriftet).

Weiter posterior befinden sich dorsal und ventral zwei faserreiche Kommissuren (maximal zehn Fasern), die jeweils aus zwei Streben bestehen (Abb. 3.51, B, S. 108).

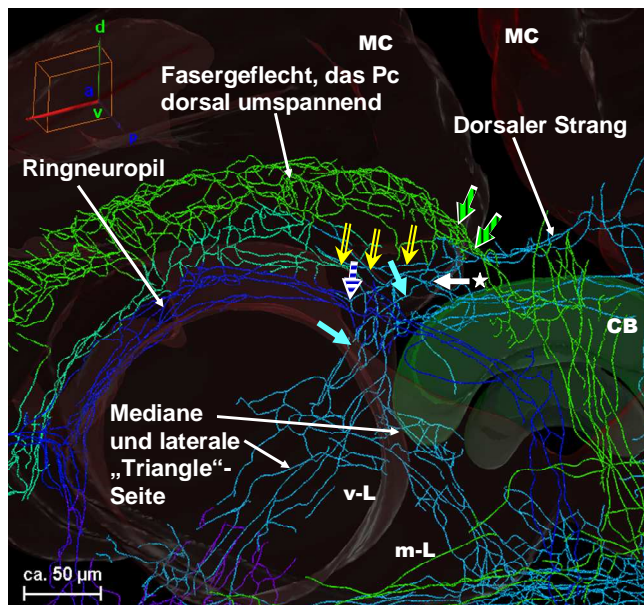


Abb. 3.63: Kreuzungsbereich lateral des dorsalen Stranges der dorsalen „Doppelkommissur“. Rechte Hemisphäre, anterior. Beschreibung im Text.

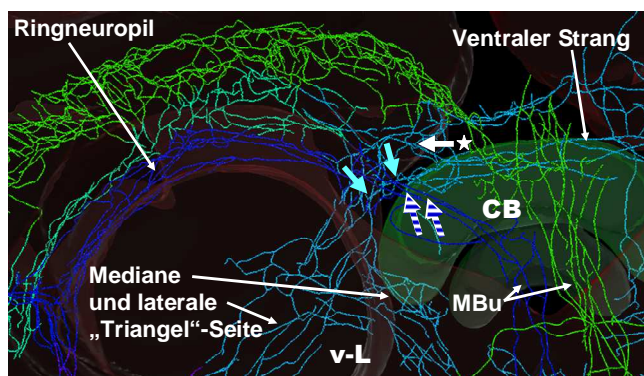


Abb. 3.64: Kreuzungsbereich lateral des ventralen Stranges der dorsalen „Doppelkommissur“. Maßstab und Ansicht analog vorherige Abbildung.

#### Die **dorsale „Doppelkommissur“**

verläuft in einer Tiefe von ca. 145 bis 170 µm. Die weiter dorsal liegende Strebe erhielt die Bezeichnung „dorsaler Strang der dorsalen Querverbindung“ (145 bis 170 µm Tiefe) und die weiter ventrale „ventraler Strang der dorsalen Querverbindung“ (150 bis 170 µm Tiefe). Links wie rechts der „Doppelkommissur“ befindet sich ein stark verzweigender Kreuzungsbereich.

Der **dorsale Strang der dorsalen „Doppelkommissur“** verläuft von median kommend betrachtet (Abb. 3.63)

- in das grün visualisierte, den dorsalen Rand des Protocerebrallappens umspannende Band (grün gestreifte Pfeile);
- in das türkisblau gezeichnete Bündel, das parallel zu dem eben erwähnten Band verläuft (gelbe Rahmenpfeile);
- in das dorsal um den v-Lobus verlaufende Ringneuropil (dunkelblau), wobei sich eine Faser deutlich in dieses Neuropil aufgabelt (weiß-blau quer gestreifter Pfeil);
- in die aus der „medianen“ und „lateralen“ Seite zusammenführende Ecke des „Triangles“ posterior der Pilzkörper (hellblaue Pfeile);
- mit Fasern des ventralen Stranges der dorsalen „Doppelkommissur“ zusammen, wobei es sich um eine Gabelung oder Überkreuzung handeln kann (weißer Pfeil mit Stern).



Nicht lateral sondern median, etwa auf halber Strecke des dorsalen Stranges der dorsalen Querverbindung, scheint eine Faser die Fortsätze zu kontaktieren, die in einem leichten Bogen posterior des Zentralkomplexes verlaufen (siehe auch 3.3.4.6 und Abb. 3.69, S. 124, weißer Pfeil mit Sternchen). Ansatzweise erkennt man in dem mittleren Bereich einige weitere Fasern, die die gleiche Richtung einschlagen, aber nicht zusammenführend gefärbt sind.

Der **ventrale Strang der dorsalen „Doppelkommissur“** zieht von der Mitte herkommend gesehen (Abb. 3.64),

- in das dunkelblau rekonstruierte Ringneuropil (weiß-blau gestreifte Pfeile);
- in die aus der „medianen“ und „lateralen“ Seite zusammenführende Ecke des „Triangel“ (hellblaue Pfeile);
- in eine Faser, die den Zentralkörper (CB) dorsolateral schneidet (siehe Kapitel 3.3.4.6 und Abb. 3.73, S. 125, gelbe Pfeile);
- mit Fasern des dorsalen Stranges zusammen (s.o.), wobei hier im Anschluss durchaus ein Weiterverlauf in die oben erwähnten grün und türkisblau realisierten Bänder erwägt werden sollte (weißer Pfeil mit Stern in Abb. 3.63).
- Ein Fortsatz verbindet die „Triangel“-Ecke mit dem Übergangsbereich zwischen türkisblauem Band und grünem, das Pc umspannende Geflecht und hat keinen Kontakt mit den Kommissuren, sondern durchquert lediglich die Kreuzungszone (ohne Abbildung).

Die Verbindungen „Triangel“ mit dorsalem Kommissurstrang und „Triangel“ mit ventralem Kommissurstrang liegen nicht in einem Punkt, sondern sind eine Nuance getrennt: erstere liegt mehr dorsolateral, letztere mehr ventromedian. Der Weiterverlauf in Richtung laterale „Triangel“-Seite in der rechten Hemisphäre gestaltet sich jedoch nicht in getrennten Bahnen, sondern wird von Überkreuzungen bzw. Gabelungen geprägt. In der linken Gehirnhälfte dagegen setzt sich die laterale „Triangel“-Seite aus zwei parallelen Strängen zusammen, die in etwa der Hälfte durch eine senkrecht dazu verlaufende Faser verbunden sind (Abb. 3.51, A, S. 108, gelber Rahmenpfeil: Die links im Bild zu sehende laterale „Triangel“-Seite kann als in zwei Bahnen verlaufend betrachtet werden). PDF-Neuriten aus dem ventralen Strang der dorsalen Querverbindung gabeln sich allerdings vor dem Übergang in beide lateralen „Triangel“-Stränge auf, der dorsale scheint sich ebenfalls zu teilen.

Die **ventrale „Doppelkommissur“** besteht gleichfalls aus zwei separaten Streben, dem mehr anterior in einer Tiefe von 210 bis 240 µm verlaufenden „anterioren“ und dem mehr posterior zwischen 250 bis 290 µm Tiefe passierenden „posterioren Strang der ventralen Querverbindung“ (Abb. 3.51, B, S. 108).

### In dem **anterioren Strang der ventralen „Doppelkommissur“**

- ziehen die medianen „Triangel“-Seiten jeweils lateral in die Kommissur hinein bzw. aus ihr heraus (Abb. 3.51, B, S. 108, schwarz-weiß, schräg gestreifte Pfeile);
- setzen sich die ventralen „Triangel“-Seiten fort (Abb. 3.51, B, S. 108, gelb-schwarz, quer gestreifte Pfeile);
- zweigen jeweils lateral Fasern in die Antennalloben ab (keine Abbildung);
- verbinden mittig und auf seiner anterioren Seite etwa vier bis sechs Fortsätze das „*median bundle*“ (MBu) mit demselben, wobei sie senkrecht zum MBu sowie zur Kommissur stehen (ohne separate Abbildung, gelbe Rahmenpfeile in Abb. 3.65, B, S. 122, weisen darauf hin);
- scheinen mittig auf der posterioren Seite seines Verlaufs Fasern zu „entspringen“ (gelbe, zunächst bei der Kommissur noch blaue Fasern in Abb. 3.74, S. 125), die posterior um den Zentralkörper (CB) laufen (Abb. 3.71, S. 124, gelbe Fasern zwischen CB und PBr), dann teilweise in die mediane Ozelle ziehen, teilweise um die lateralen „Enden“ der oberen Untereinheit des Zentralkörpers schwenken, ihn dabei streifen, dann vermutlich in den ventralen Strang der dorsalen „Doppelkommissur“ eintreten (Abb. 3.73 und Abb. 3.74, S. 125, gelbe Pfeile) und zudem mittig in den dorsalen Strang derselben führen (vgl. oben letztes Merkmal in der Beschreibung des dorsalen Stranges der dorsalen Querverbindung sowie Kapitel 3.3.4.6).

### Der **posteriore Strang der ventralen „Doppelkommissur“** enthält

- Fasern, die senkrecht zu ihm in die Ozellen, vor allem in die lateralen Ozellen abzweigen (hellblau-rot, senkrecht gestreifter Pfeil in Abb. 3.72, S. 125);
- Neuriten, die in die Antennalloben projizieren, wobei anscheinend einige Fasern kontralateral verlaufen (Abb. 3.65, S. 122);
- eine Faser aus jeder ventralen „Triangel“-Seite, die sich nach posteromedian absenkt (beidseitig von lateral nach median betrachtend) und zusammen mit den Fasern des posterioren Stranges der ventralen „Doppelkommissur“ die Mitte durchquert, wobei nicht erkennbar ist, ob es sich um die gleiche Faser oder um zwei sich in der Kommissur verzweigende oder aneinander vorbeilaufende Fortsätze handelt (gelbe Pfeile in Abb. 3.51, B, S. 108);
- auf jeder lateralen Seite eine Faser (ev. zwei), die von median kommend nach dorso-lateral zur medianen „Triangel“-Seite zieht (weiße Rahmenpfeile in Abb. 3.51, B).

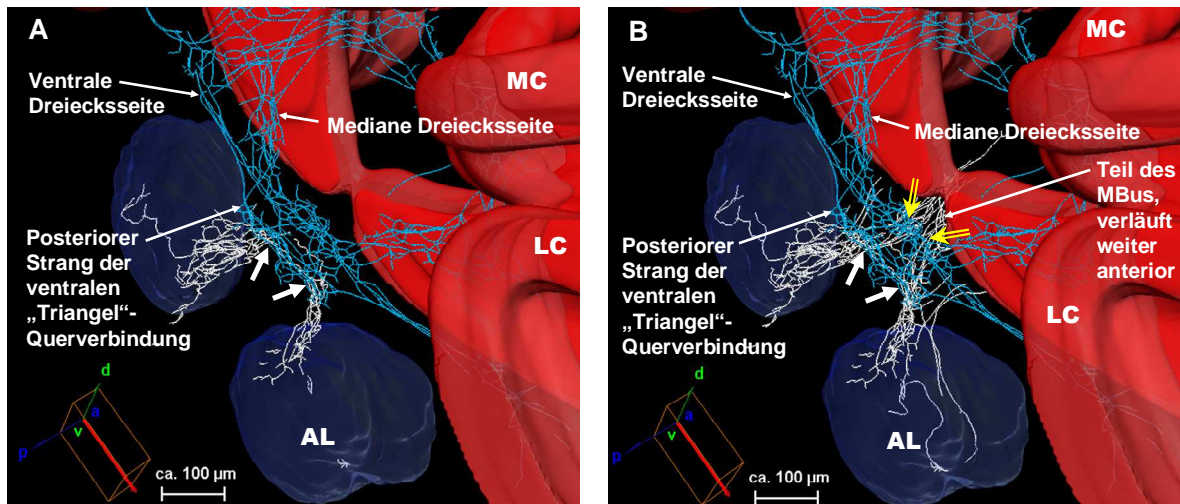


Abb. 3.65: Aus der posterior-ventralen Kommissur ziehen PDF-Neuriten in die Antennalloben (AL). In A ist der Teil der Neuriten ausgeblendet, der anterior aus dem „median bundle“ (MBu) stammt bzw. anteriorer verläuft. Die weißen Pfeile deuten auf die Übergangsstellen zwischen Kommissur und den zu den ALs ziehenden Fasern. Einige kommissurale Fasern sind ebenfalls in Weiß dargestellt, weil sie sich direkt zu den ALs verfolgen ließen. Die gelben Rahmenpfeile zeigen auf den Bereich, in dem die Fasern senkrecht das MBu und den anterioren Strang der ventralen Querverbindung verbinden (ohne detaillierte Abb.).

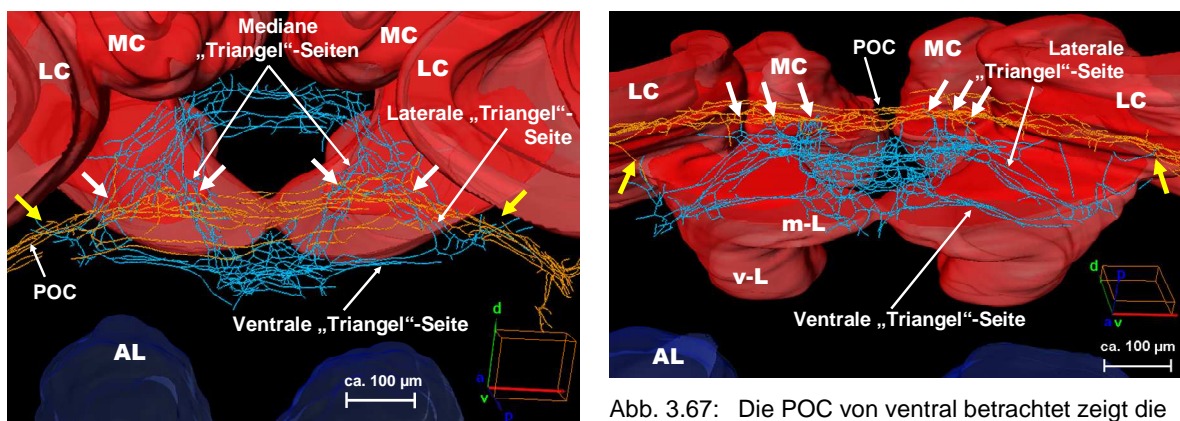


Abb. 3.66: Die „posterior optic commissure“ (POC) und die Neuriten des „Triangels“, posterior. Die Übergänge konzentrieren sich auf die mittleren Bereiche der lateralen und medianen Dreieckschenkel (weiße Pfeile) und auf die lateralen Ecken (gelbe Pfeile).

Abb. 3.67: Die POC von ventral betrachtet zeigt die Übergänge mit dem „Triangel“ (weiße und gelbe Pfeile wie in Abb. 3.66).

Direkt unter der Oberfläche der posterior geneigten Rückseite des Protocerebrums, ventral der Protocerebralbrücke (PBr, Abb. 3.70, S. 124), quert eine ausgeprägte Kommissur das Bienen Gehirn, die „**posterior optic commissure**“ (POC). In ihr verlaufen PDF-Neuriten (orange Fasern in Abb. 3.13, S. 90, Bild B bis E). Die POC ist in antero-posteriorer Ausrichtung leicht gebogen (Bild B), zu den lateralen Seiten hin folgt sie dem Innenrand des Neuropils (sie startet räumlich betrachtet in einer Tiefe von etwa 300 µm), median reicht sie am weitesten nach posterior (bis etwa 450 µm Tiefe, was gleichzeitig der hinteren Begrenzung des Protocerebrums entspricht).

Die PDF-Fortsätze der POC treten beidseitig in die „Loops“ ein und verbinden so die kontralateralen optischen Loben (Abb. 3.33, S. 98). Posterior der m-Loben – die POC

quert posterior der Pilzkörper durch das Gehirn (Abb. 3.66, S. 122) – bestehen mannigfaltig Kontakte zum „Triangel“, die sich auf den mittleren Bereich der medianen und lateralen Dreiecksseiten konzentrieren (Pfeile in Abb. 3.66 und Abb. 3.67). An den lateralen Winkeln des „Triangels“ verbindet je eine Faser die beiden Strukturen (Abb. 3.67, gelber Pfeil). Verbindungen zu den Ozellen-Neuriten werden in 3.3.4.6 behandelt.

#### **3.3.4.6 PDF-Neuriten in den Ozellen**

Die PDF-Neuriten projizieren bei der Honigbiene sowohl in die mediane Ozelle (MOc) als auch in die beiden lateralen Ozellen (LOc, Abb. 3.68, S. 124). Das Terminationsgebiet beschränkt sich in der MOc auf den ventralen Rand (Abb. 3.71). Die Fortsätze reichen bis zur anterioren Grenze und verästeln sich zum Ende hin. In den LOcs verlängern sie sich ventral bis zur anterioren Begrenzung (Abb. 3.71), weisen jedoch an ihren Enden kaum Verzweigungen auf und bleiben am lateralen Rand (Abb. 3.68).

Tendenziell ziehen die PDF-Fasern über die ozellaren Trakte posterior der Protocerebralbrücke (PBr) in die Ozellen. Im mittleren Linsenauge entstammen sie vermutlich sowohl aus Fasern, die hinter der PBr entlangziehen (Überkreuzungsbereich, Abb. 3.71, Klammer), als auch aus Fasern, die anterior der Brücke verlaufen. Diese differenzieren sich in Fortsätze, die von anterior des Zentralkörpers (*central body*, CB) herführen sowie in solche, die sich zwischen CB und PBr erstrecken (gelbe Fasern). Innerhalb der Ozellen-trakte scheinen die PDF-Neuriten einerseits ipsilateral zu verlaufen, andererseits kontralateral. Zahlreiche Verzweigungen erschweren ein genaues Verfolgen und Zählen der Fortsätze. Der Rekonstruktion nach zu urteilen ziehen zwei Fasern in jede MOc-Hälfte und etwa bis zu sechs in jeden LOc, wobei nur zwei davon bis ans „Ende“ reichen. Die anderen scheinen vorher zu kreuzen oder zu terminieren (Abb. 3.68, Abb. 3.70). Die Ozellen-PDF-Neuriten stehen allem Anschein nach in Kontakt mit der POC. Dabei gibt es zwei Zonen. Einmal im Hauptstrang der POC (gelber Pfeil in Abb. 3.70), ein andermal in zwei mehr ventral verlaufenden parallelen Fasern der POC (rot-orange gestreifter Pfeil). Allerdings könnten die Fortsätze auch aneinander vorbeiziehen. Aufgrund der Färbung in Varikositäten ist dies nicht eindeutig feststellbar. In Abb. 3.72, S. 125, scheinen die Fasern aus dem posterioren Strang der ventralen „Doppelkommissur“ herauszuziehen (rot-blau senkrecht gestreifter Pfeil). In diesem Bereich projizieren u. a. zahlreiche PDF-Neuriten in die Antennalloben (3.3.4.7). Posterior des CBs und anterior der PBr ziehen bündelig gelb rekonstruierte Fasern entlang (Abb. 3.71). Vereinzelt scheinen Fasern daraus in die mittlere Ozelle (MOc) zu laufen, weswegen sie in einer Farbe dargestellt wurden. Die nähere Betrachtung zeigt, dass der Hauptteil dieses Bündels nicht zur MOc führt.

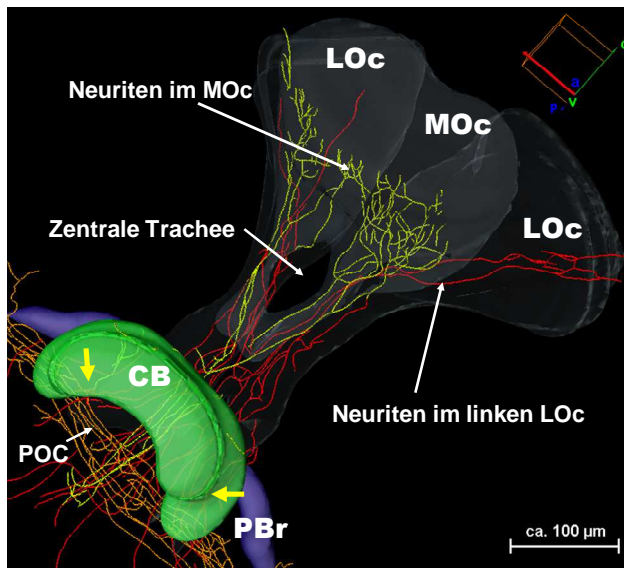


Abb. 3.68: Die PDF-Neuriten in den Ozellen von anterior. Die PDF-Neuriten in der medianen Ozelle (MOc) sind gelb, die in den lateralen Ozellen (LOc) rot koloriert. Gelbe Pfeile: je eine Faser, die sich in der POC fortsetzt.

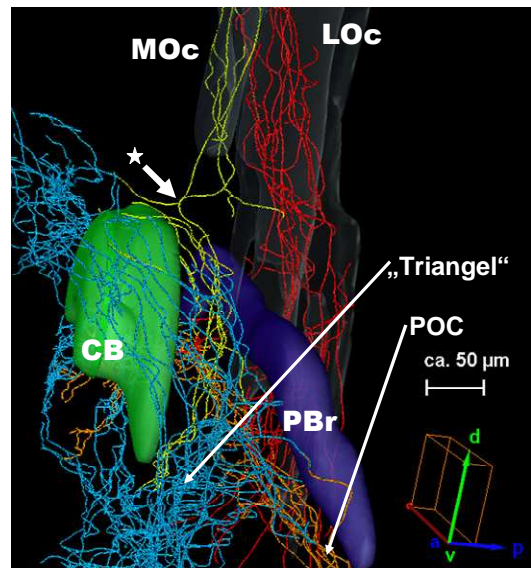


Abb. 3.69: Die ozellaren Trakte von lateral. Der Pfeil deutet auf eine „Kreuzung“, Beschreibung siehe Text.

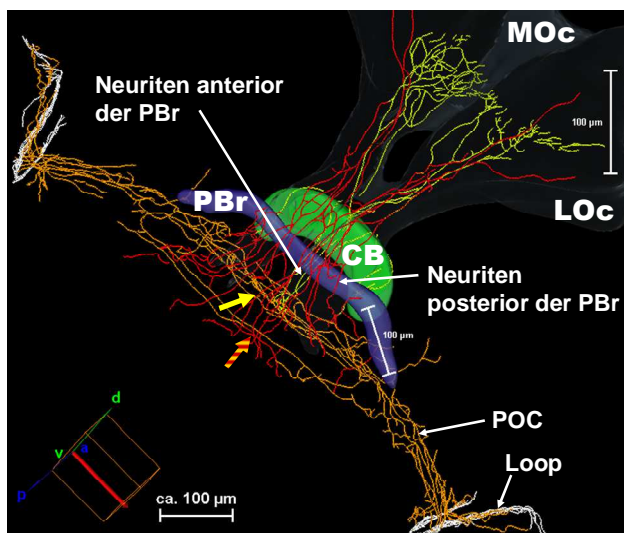


Abb. 3.70: Die PDF-Neuriten in den ozellaren Trakten von posterior. Vermutliche Kontaktbereiche der ozellaren PDF-Neuriten mit der POC.

In die Abbildung integriert ist die Problematik bei der Maßstabsangabe in 3D-Bildern: 100 µm weiter vorne (hier LOc) erscheinen länger als weiter hinten (hier PBr).

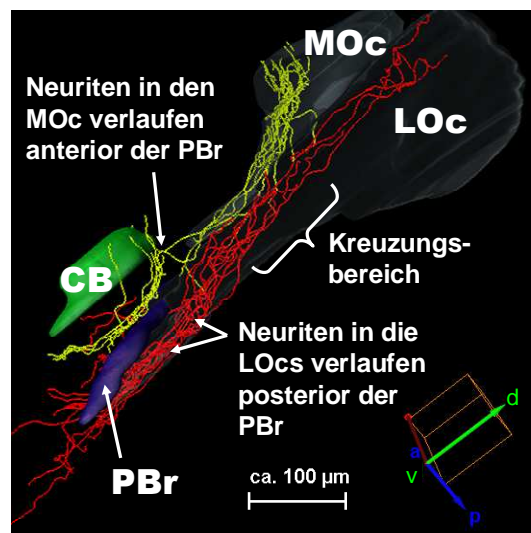


Abb. 3.71: Die PDF-Projektionen in den Ozellen von lateral. Im Vordergrund ist die linke LOc. Im MOc terminieren die PDF-Neuriten ventral im Neuropil. Die Neuriten ziehen posterior der PBr in die LOcs (rot) und zwischen CB und PBr unter anderem in den MOc (gelb).

Die mittig sichtbaren gelben PDF-Fasern (Abb. 3.73, weiße Pfeile und Abb. 3.74, durch den CB durchscheinend zu sehen, beide S. 125) verlaufen in einem leichten Bogen posterior um den CB (Abb. 3.71). Ihre bildlich gesehene Herkunft liegt in dem anterioren Strang der ventralen Doppelkommissur (Abb. 3.74). Dorsal des CBs enden sie in der Rekonstruktion teilweise blind, eine Verknüpfung mit dem ventralen Strang der dorsalen Querverbindung ist denkbar, aber nicht gefärbt.



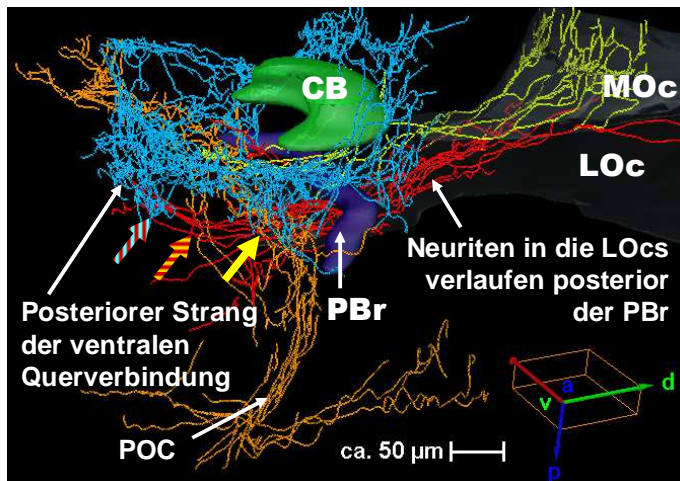


Abb. 3.72: Übergänge zwischen ozellaren PDF-Neuriten und POC sowie dem posterioren Strang der ventralen „Doppelkommissur“. Ansicht von lateral.

Der CB ist nur mit seiner oberen Untereinheit abgebildet, die untere sowie die Noduli sind ausgeblendet.

Hellblau-rot, senkrecht gestreifter Pfeil: Übergang posterior-ventraler Strang mit Fasern in LOcs.

Rot-oranger, quer gestreifter Pfeil: Ev. Kontaktzone wie in Abb. 3.70.

Gelber Pfeil: Kontaktzone POC und PDF-Neuriten, die posterior der PBr verlaufen.

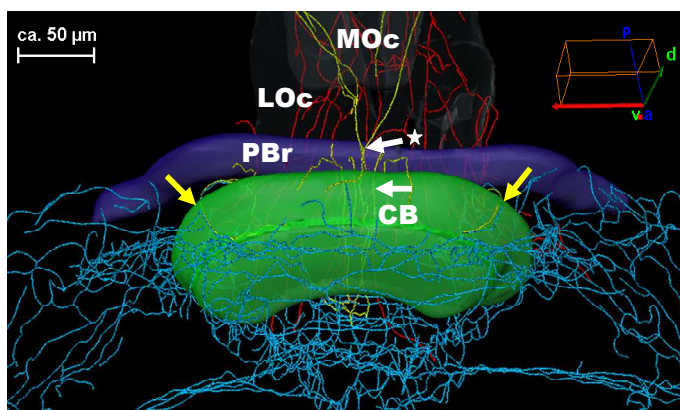


Abb. 3.73: Die PDF-Fasern um den CB herum. Ansicht von dorsal.

Links und rechts schneidet eine PDF-Faser die obere Untereinheit des CBs (gelbe Pfeile). Diese Faser ist doppelt eingeblendet, einmal als Bestandteil der „Triangel“-Fasern (blau), ein andermal zu dem MOC-Modul gehörend (gelb). Die Faser zieht aber nicht in den MOC (siehe Text). Die weißen Pfeile deuten auf PDF-Fasern, die zwischen CB und PBr verlaufen, genaue Beschreibung siehe Text.

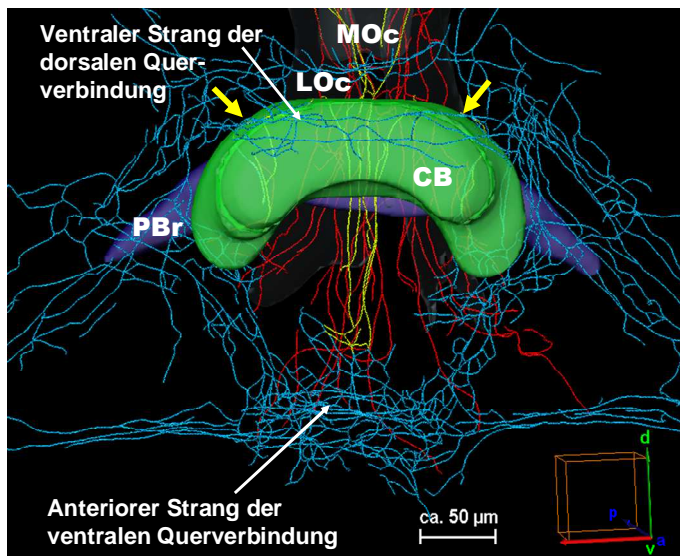


Abb. 3.74: Die ozellaren PDF-Neuriten posterior des CBs. Ansicht von anterior.

Im Bild mittig in der Senkrechten ziehen die (gelben) Fasern, vom anterioren Strang der ventralen „Doppelkommissur“ posterior des CBs in Richtung MOC. Auf jeder lateralen Seite zieht eine Faser nach lateral außen und schneidet den Zentralkörper (gelbe Pfeile).

Die ganz in der Mitte verlaufende Faser scheint mit dem dorsalen Strang der dorsalen Querverbindung verknüpft. Der Neurit besitzt eine Kreuzung, an der vier Äste zu sehen sind (weißer Pfeil mit Stern in Abb. 3.69, S. 124). Er kommt wie beschrieben von ventral, gabelt sich in einen Ast nach dorsoanterior in Richtung dorsoanteriore Kommissuren, außerdem ziehen zwei Äste in den MOC, einer in die linke, der andere in die rechte MOC-Hemisphäre (Abb. 3.73, S. 125, weißer Pfeil mit Stern). Ungewiss ist, ob es sich tatsächlich um eine Verzweigung oder um zwei sich überkreuzende Fasern handelt.

Je eine PDF-Faser schneidet lateral außen, leicht dorsal, die „*upper division*“ des CBs (in Abb. 3.73 auf S. 125 ist sie blau-gelb, da sie über zwei Module, dem „Triangle“- und dem „Ocelli“-Datensatz, doppelt eingeblendet ist). Bildlich betrachtet liegt ihr Ursprung entweder in der POC oder/und in der medianen „Triangle“-Seite, was wegen zahlreicher Verzweigungen nicht genauer definierbar ist (ohne Abbildung, durchscheinend erkennbar in Abb. 3.68, S. 124, gelbe Pfeile). Verfolgt man diese Faser jeweils nach dorsoanterior, so tritt sie in den ventralen Strang der dorsalen Querverbindung ein; in der rechten Hemisphäre gabelt sie sich deutlich in die lateral entgegengesetzten Richtungen (Abb. 3.73, S. 125, linker gelber Pfeil) dieses Querstranges, links dagegen endet sie kurz vor diesem.

#### **3.3.4.7 PDF-Neuriten im Deutocerebrum bzw. in den Antennalloben**

Die Antennalloben, die zum Deutocerebrum gehören, werden von einigen wenigen PDF-Neuriten innerviert. Dabei beschränken sich die Fasern auf den dorsalen (Abb. 3.75, S. 127) und gleichzeitig posterioren (Abb. 3.76) Bereich des Neuropils, d. h. auf die dorsal-caudale Hemisphäre (Kirschner et al., 2006). Die PDF-Fasern ziehen hauptsächlich über das „*median bundle*“ in die Antennalloben hinein (Abb. 3.77, A, S. 127).

Ein Vergleich der zugrunde liegenden mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.77) mit dem 3-D-Atlas nach Galizia et al. (1999) sowie mit den dazugehörigen Trakten nach Kirschner et al. (2006) lässt vermuten, dass die PDF-Fasern an den Rändern bestimmter Glomeruli bzw. im Bereich efferenter Trakte entlangziehen. Grundsätzlich innervieren vier antennale sensorische Trakte (T1–4) jeweils ein Set an Glomeruli (T1- bis T4-Cluster) im Antennallobus, zwei weitere ziehen am Lobus vorbei und terminieren im mechanosensorischen Zentrum des Deutocerebrums, im sogenannten dorsalen Lobus (T5), sowie im Subösophagealganglion und im caudalen Protocerebrum (T6; zusammengefasst in Kirschner et al., 2006). Die PDF-Fasern befinden sich im am weitesten posterior liegenden Areal der Antennalloben.

In dieses Gebiet geschieht die Afferenz über den antennalen sensorischen Trakt T4, dessen Glomeruli die Bezeichnungen D01 bis D07 bzw. D08 innehaben (vgl. Galizia et al., 1999; Kirschner et al., 2006). Mikroskopisch zu erkennen sind diese Glomeruli an ihrer homogenen Struktur, da die T4-Rezeptorzellen im ganzen Glomerulus terminieren. Die meisten anderen Glomeruli weisen einen Kern (*core*) und einen deutlichen Rand (*cortex*) auf, bei ihnen enden die Rezeptorzellen nur im Cortex (Galizia et al., 1999).



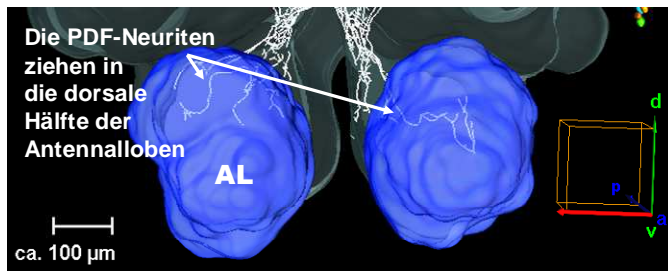


Abb. 3.75: Die PDF-Fasern im Antennallobus von anterior. Deutlich ist der in dem Neuropil dorsale Verlauf zu erkennen.

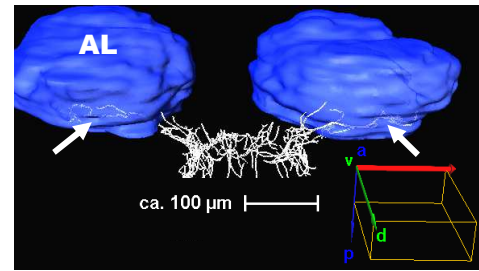


Abb. 3.76: Die PDF-Fasern im Antennallobus von dorsal. Pfeile: posteriorer Verlauf innerhalb des Neuropils.

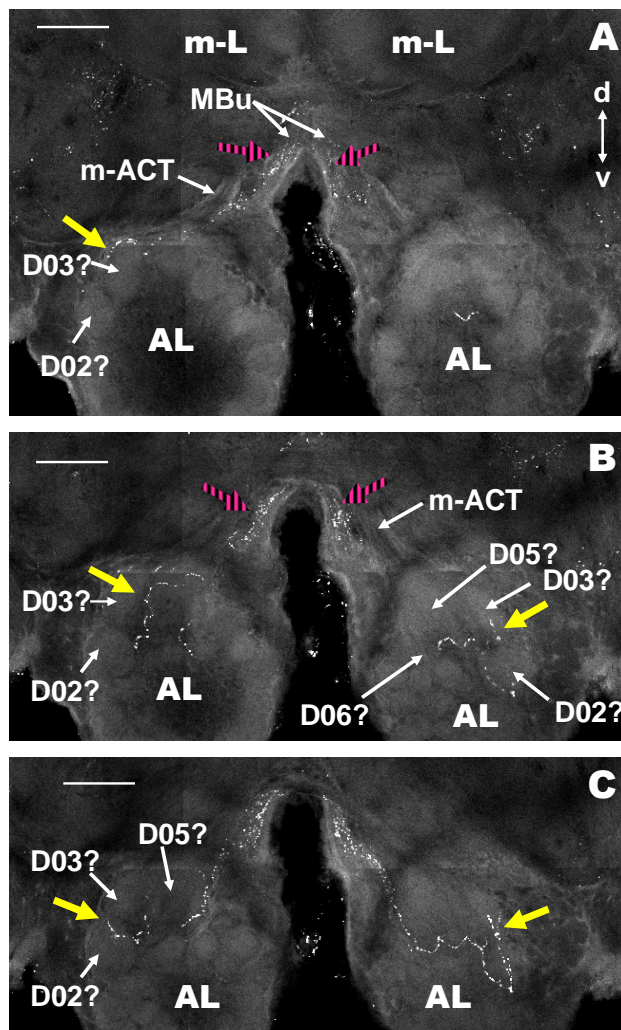


Abb. 3.77: Die Antennalloben mit den PDF-Neuriten (mikroskopische Bilder). Ansicht von anterior. Von A nach C liegt jedes Bild etwa 20 µm weiter posterior. Einzelne Glomeruli und ihre Nomenklatur = D0X, Skalierungsbalken = 100 µm.

Gelbe Pfeile: Die PDF-Neuriten verlaufen zwischen den Glomeruli oder an deren Rand.  
Magenta-schwarz linierte Pfeile: Die PDF-Fasern im „median bundle“ (MBu).

Eine definitive Zuordnung der Glomeruli erlauben die Bilder dennoch nur eingeschränkt. Wahrscheinlich handelt es sich um D02, D03, D05 und D06 (Abb. 3.77, Bild B). Die im Lobus extrem posterioren PDF-Fasern könnten aber auch auf Höhe der efferenten Trakte verlaufen. Allgemein verlassen den Antennallobus insgesamt fünf Antennocerebraltrakte (ACTs, Kirschner et al., 2006), von denen der m-ACT (m für medial) dorsomedian herauszieht, median des v-Lobus zu den Pilzkörpern und weiter nach lateral und schließlich ventral ins laterale Horn (LH) läuft. Er enthält uniglomeruläre Projektionsneurone, die u. a. mit den mutmaßlich identifizierten Glomeruli – außer mit D02, der in Kirschner et al. (2006) färbetechnisch nicht zugeordnet werden konnte – verschaltet sind (siehe Kirschner et al., 2006).

## 4 Diskussion

### 4.1 PDF-Oszillationen im Gehirn der Honigbiene

In vier Experimenten wurden die PDF-Oszillationen in den Gehirnen von Sammel- und Stockbienen untersucht. Die ersten beiden Versuche konzentrierten sich auf mögliche Unterschiede zwischen Stock- und Sammelbienen anhand von vier (Experiment 1) und sechs (Exp. 2) Zeitpunkten. Die Tiere stammten aus Israel. In den beiden letzten Versuchen wurden Sammelbienen aus Regensburg unter LD (Exp. 3) und DD (Exp. 4) verglichen. Im Folgenden werden die Experimente getrennt und detailliert diskutiert.

#### 4.1.1 Sammel- und Stockbienen anhand von vier Zeitpunkten (1. Exp.)

Bei Sammel- und Stockbienen, die direkt dem Bienenstock entnommen wurden und sich primär betrachtet in ihrer Zugehörigkeit unterscheiden, ob sie in einem diurnalen Rhythmus oder rund um die Uhr aktiv sind, zeigen sich tendenziell ähnliche Oszillationen in Bezug auf die Anzahl der PDF-Neurone und die PDF-Färbeintensität in Abhängigkeit der Zeit.

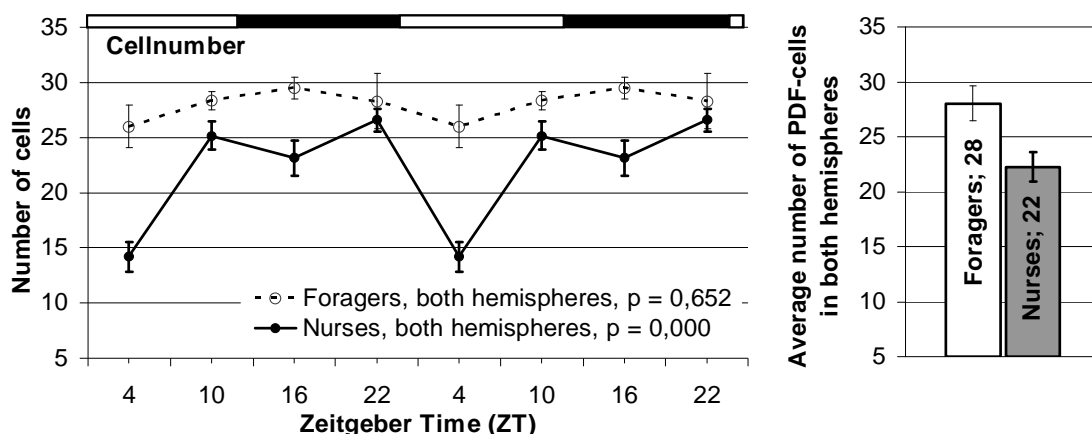


Abb. 4.1: Die Anzahl der PDF-Somata in Gehirnen von Sammel- („foragers“) und Stockbienen („nurses“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit anhand von 4 gemessenen Zeitpunkten (linke Grafik) sowie die durchschnittliche PDF-Zellanzahl beider Arbeitergruppen (rechts). Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Bei beiden Tiergruppen gab es ein gemeinsames Minimum in der PDF-Zellanzahl zu ZT4, vier Stunden nach „Licht-an“, in diesem Experiment treffender formuliert nach Sonnenaufgang (Abb. 4.1). Zur vorausgehenden Messung bei ZT22 dagegen konnten die meisten PDF-Zellen (Stockbienen) bzw. deutlich mehr (Sammelbienen) ausgezählt werden und sechs Stunden später bei ZT10 ist der Wert bereits wieder auf sein altes Niveau an-

gestiegen. Allgemein scheinen zum Zeitpunkt des Sonnenaufgangs weniger Neurone im Gehirn der Hymenoptere PDF zu bilden.

Das Minimum bei ZT4 ist bei den Stockbienen besonders intensiv ausgeprägt und der zeitliche Verlauf auch nur bei ihnen signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei den Sammelbienen ist eine entsprechende Verringerung in der Zellanzahl zwar grafisch zu erkennen, jedoch in ihrer Dimension deutlich dezenter und der Fortlauf nicht signifikant. Stockbienen sind dem Tageslicht aufgrund ihres Aufenthaltsortes nicht ausgesetzt, da sie rund um die Uhr im dunklen Bienenstock tätig sind. Der Hell-Dunkel-Wechsel sollte sich daher nur auf die PDF-Expression im Sammelbienenhirn auswirken. Hier zeichnet sich die Reduzierung aber deutlich schwächer ab. Vielleicht maskiert das Licht eine Oszillation der PDF-Zellanzahl, die folglich nur bei den im dunklen Bienenstock aktiven Stockbienen verzeichnet wurde. Diese Tatsache lässt jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Aktivität der Tiere zu, da Stockbienen, die einem Hell-Dunkel-Wechsel im Bienenstock ausgesetzt werden, ihre Aktivität nicht verändern, sie bleiben arrhythmisch und bei ihren Aufgaben (Shemesh et al., 2007; 2010). Um zu prüfen, ob PDF als Neurotransmitter oder Neuromodulator bei der Kontrolle der Lokomotoraktivität bzw. des -rhythmus wie bei *Drosophila melanogaster* (Helfrich-Förster, 1997; Helfrich-Förster et al., 2000) oder *Leucophaea maderae* (Stengl and Homberg, 1994; Petri and Stengl, 1997; Reischig and Stengl, 2003a) eine Rolle spielt, müssten in zukünftigen Studien Stockbienen, die im Bienenstock einem Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt werden, auf ihre zeitliche Veränderung der PDF-Zellanzahl untersucht werden. Als auslösende Faktoren für das unterschiedliche rhythmische Verhalten stehen neben dem Alter vor allem soziale Kontakte zur Diskussion. Stockbienen, die aus ihrem Stock entfernt und isoliert gehalten werden, verändern sogar unter konstanten Bedingungen ihr Verhalten und werden rhythmisch (Shemesh et al., 2007; 2010). Diesbezüglich könnte die Anzahl der PDF-Neurone tatsächlich mit den rhythmischen Verhaltensweisen in Verbindung gebracht werden. Als auslösender Faktor für die Verhaltensänderung wird in den Publikationen der Kontakt zur Brut genannt, wobei die Komponenten unbekannt sind. Also müssten Sammel- und Stockbienen zudem mit und ohne Brutkontakt innerhalb des Stocks auf ihre zeitliche Veränderung der PDF-Zellanzahl getestet werden, um herauszufinden, ob der Brutkontakt sich auf die Anzahl oder die Expressionsmuster der PDF-Neurone auswirkt.

Bei der Schabe *L. maderae* wirken sich unterschiedliche Licht-Behandlungen vor allem auf die mittelgroßen aPDFMe-Neurone aus (Wei and Stengl, 2011; PDF-Zellen der Schabe siehe Einleitung 1.5.2). Unter LD 11:11 kommen signifikant weniger, unter 13:13 signifikant mehr Zellen vor als unter 12:12. Die Veränderung der Photoperiode wirkt also auf spezielle PDF-Neurone. Auch auf die Modulierung eines 24-Stunden-Rhythmus reagieren

nur bestimmte Zellen. So erhöht sich unter LD 18:6 zusätzlich zu der Anzahl der mittelgroßen aPDFMe-Neurone auch die der großen aPDFMe- und die der pPDFMe-Neurone. Dagegen verringert sie sich unter LD 6:18 nur bei den mittelgroßen aPDFMes. Wei and Stengl (2011) schreiben, dass die „*medium-sized*“ aPDFMe-Neurone eine inhomogene Gruppe von Zellen sein könnten, von denen die meisten stärker durch Licht aktiviert werden und mindestens eine stärker durch Dunkelheit gehemmt wird. Es wäre auch bei der Biene denkbar, dass bei Individuen, die dem Licht bzw. einem LD-Zyklus ausgesetzt sind, bestimmte PDF-Neurone zusätzlich detektierbar sind. Die bei ZT4 auffallend stärkere Reduktion könnte ebenfalls auf einer Inhomogenität der PDF-Zellen ähnlich der Schabe basieren. Diese Hypothese müsste in Bezug zum Licht und zum Brutkontakt getestet werden.

Unter Betrachtung der Gesamtanzahl an PDF-Neuronen lässt sich die Honigbiene mit der taxonomisch nahe verwandten Hummel *Bombus terrestris* (Weiss et al., 2009) vergleichen. Beide Hymenopteren-Arten weisen pro Gehirnhemisphäre bis zu 15 PDF-Zellen auf. Die Anzahl an PDF-Somata im Gehirn der Honigbiene ist allerdings bei den Sammelbienen zu jedem Zeitpunkt höher als bei den Stockbienen (Abb. 4.1) und könnte als altersabhängiger, aufgaben- und/oder aktivitätsbezogener Unterschied angesehen werden. Ein vergleichbares Phänomen entdeckten Weiss et al. (2009) bei *B. terrestris*, bei der große Tiere, unabhängig vom Alter, einen strengen diurnalen Rhythmus in ihrem Verhalten zeigen und tagsüber Nektar und Pollen sammeln, wohingegen kleine arrhythmisch sind und im Nest bleiben (Yerushalmi et al., 2006). Die Studie nach Weiss et al. (2009) beschreibt eine signifikant höhere Anzahl an PDF-Neuronen in den Gehirnen großer Hummeln als in denen kleiner, wobei die Differenz zwischen ein bis drei Zellen pro Hemisphäre beträgt. Bei der Honigbiene kommen im Sammelbienenhirn (beide Hemisphären, Abb. 4.1, rechte Grafik) im Durchschnitt sechs Zellen mehr vor (28) als im Stockbienenhirn (22). Dies könnte als Indiz für die unterschiedliche Aktivität gewertet werden. Die Diskrepanz besteht jedoch nicht kontinuierlich über die Zeitachse hinweg (linke Grafik), sondern ist besonders zum Zeitpunkt ZT4 ausgeprägt, zu dem sie sich auf zwölf PDF-Neurone in beiden Hemisphären zusammen bezieht. Zwischen ZT10 und ZT22 beläuft sich der Unterschied auf zwei bis sechs PDF-Zellen und entspricht in diesem Bereich den Angaben für die Hummel nach Weiss et al. (2009). Über zeitliche Veränderungen in der Anzahl der PDF-Somata finden sich keine Angaben für die Hummel.

Mit ungefähr 15 pro Hemisphäre kommen bei beiden Hymenopteren mehr PDF-Zellen im Gehirn nahe der Medulla vor als bei anderen Holometabolen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* (z. B. Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Helfrich-Förster et al., 2007a),

der Stubenfliege *Musca domestica* (Pyza et al., 2003) oder der Schmeißfliege *Protophormia terraenovae* (Nässel et al., 1991) mit je acht „Medulla“-PDF-Neuronen.

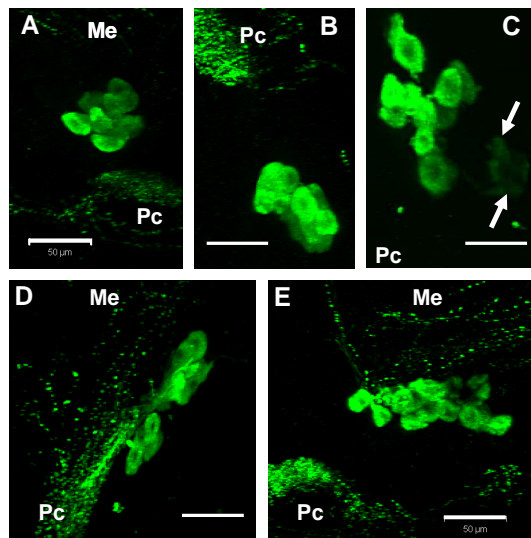


Abb. 4.2: Diverse Anordnungen der PDF-Neurone im Honigbienenhirn. Ansicht immer von anterior.

**A:** Ein Cluster in geballter Form, CT6;  
**B:** geballte Form mit Tendenz zu zwei Clustern, CT14;  
**C:** locker verteilt, zwei Zellen liegen abseits (weiße Pfeile), ZT2;  
**D:** zwei deutliche Cluster mit vielleicht verschiedenen Projektionsrichtungen, ZT14;  
**E:** lockerer Zellhaufen, Projektionen eindeutig in Richtung Me, ZT22.

Abk.: CT = *Circadian Time*; Me = Medulla und Pc = Protocerebrum (geben die Richtung der Lage an, nicht das Neuropil selbst); ZT = *Zeitgeber Time*; Messbalken = 50 µm.

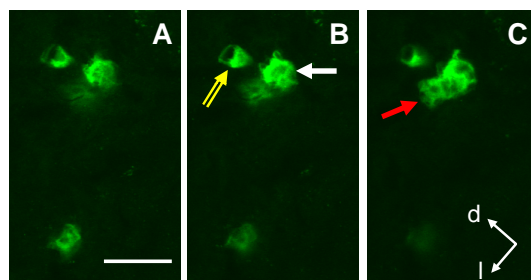


Abb. 4.3: Inhomogene PDF-Verteilung im Zytoplasma. Ansicht von anterior.

**A–C:** Drei aufeinanderfolgende Schnitte im Abstand von etwa 6 µm; Sammelbiene, ZT22. PDF ist ungleichmäßig im Zytoplasma verteilt, was das Auszählen der Zellen erschwert. Eine Zelle liegt ventral separat (linke untere Ecke).

Abk.: d = dorsal; l = lateral; Messbalken = 50 µm.

**B**, gelber Rahmenpfeil: Der Zellkern liegt auf der im Bild rechten Somaseite; unklar ist, ob es sich im linken Bereich der Zelle um Fortsätze oder einen PDF-freien Somabereich handelt. Die gleiche Schwierigkeit trifft für die anderen Zellen zu (weißer und in C roter Pfeil).

Závodská et al. (2003) untersuchten ein breites Spektrum an Insektenarten und ermittelten überwiegend weniger PDF-Neurone in den Gehirnen, wobei sie für die Honigbiene lediglich zehn Perikaryenpaare nennen. Für diese Studie sammelten sie gemäß ihren Angaben die Tiere zwischen drei und sechs Stunden nach Licht-an und analysierten entsprechend der hier vorliegenden Ergebnisse vermutlich eher das zeitliche Minimum. Bloch et al. (2003) zählten bis zu 20 PDF-Somata pro Gehirnhälfte. Aus der vorliegenden Untersuchung resultieren indes bis zu 15 PDF-Neurone. Überwiegend drängen sich die PDF-Somata in einem Zellballen dicht aneinander (Abb. 4.2, A, B). Die kumulierte Anordnung erschwert ein exaktes Zählen.

Bloch et al. (2003) versuchten, sich an den wenig oder nicht gefärbten Zellkernen zu orientieren und ließen mehrere Personen unabhängig voneinander auszählen. Auffallend in dieser Dissertation ist, dass PDF im Zytoplasma einer Zelle oft nicht homogen verteilt ist (Abb. 4.3). Präferenzen zu bestimmten Zeitgeber-Zeiten bezüglich der zytoplasmatischen PDF-Verteilung konnten nicht festgestellt werden. Durch dieses Phänomen entstehen zahlreiche, weniger gefärbte Aussparungen, die von ungefärbten Zellkernen

differenziert werden müssen. Liegen die Neurone zudem dicht gedrängt in einem Cluster, wird das Erkennen einzelner Zellen teilweise unmöglich.

Eine zusätzliche Erschwernis liegt im Auszählen von Schnittpräparaten. Zellen, die mit einem Mikrotom geteilt werden, kommen in dementsprechend vielen Schnitten vor. Bloch et al. (2003) zählten in fünf bis sechs 10 µm dicken Paraffinschnitten Zellen mit einem maximalen Durchmesser von knapp 30 µm aus. In der vorliegenden Arbeit ist die Gefahr des Mehrfachzählens allein durch die Präparatedicke (60 bis 100 µm) reduziert. Kamen die Zellcluster trotzdem in aufeinanderfolgenden Schnitten vor, wurde mit der Computersoftware ImageJ eine nachgezeichnete Kopie der Zellanordnung des letzten „slice“ eines Schnittpräparates transparent über den ersten „slice“ des folgenden Schnittes gelegt. Mittels dieser Methode konnten geteilte und damit „mehrfach vorkommende“ Zellen aus der Gesamtanzahl herausgerechnet werden. Vielleicht liegen die Differenzen darin begründet. Die Ganzhirnfärbungen bestätigten die abweichende Gesamtanzahl, wobei die Schwierigkeit des Trennens der Zellgrenzen innerhalb der kumulierten Zellcluster bestehen blieb.

Im Gegensatz zu den drei oben erwähnten Fliegenspezies konnten die PDF-Zellen der Honigbiene (Bloch et al., 2003 und diese Dissertation) wie auch der Hummel (Weiss et al., 2009) bislang nicht nach Größenklassen oder innerhalb ihres Gefüges nach einer Lage definiert werden. Bei den betreffenden Fliegenarten gibt es eine Einteilung der nahe der Medulla lokalisierten PDF-Neurone (PDFMe) in große und kleine Zellen (Literaturangaben siehe oben). Auch bei hemimetabolen Insekten wie der Schabe *Leucophaea maderae* (Reischig and Stengl, 2003b; Wei et al., 2010) oder der Raubwanze *Rhodnius prolixus* (Vafopoulou et al., 2010) existiert eine Größenklassifizierung der PDFMe-Neurone. Die kumulierte Anordnung und das weite, vermeintlich willkürliche Größenspektrum scheinen bei Hymenopteren charakteristisch zu sein.

Park et al. (2000) entdeckten bei *Drosophila melanogaster* eine zeitabhängige PDF-Oszillation in den Axonterminalen der kleinen PDF-Neurone, der s-LN<sub>v</sub>s, nicht aber in deren Zellkörpern. Sowohl die Sammel- als auch die Stockbienen weisen ebenfalls signifikante PDF-Oszillationen in allen untersuchten Faserbereichen auf (Abb. 3.1, S. 66, „Foragers/Nurses, fibers“, p-Werte alle < 0,05). In den Perikaryen (gleiche Abb., „Foragers/Nurses, cells“) registriert man zwar bei Betrachtung der Grafen tendenziell eine rhythmische Konzentrationsänderung, deren Verlauf ist aber nicht signifikant (bei den Sammelbienen wurde die Signifikanz mit einem p-Wert von 0,052 knapp verfehlt). Dies könnte ein Hinweis sein, dass ähnlich wie bei der Taufolie posttranskriptionelle Mechanismen für den rhythmischen Transport, die rhythmische Anreicherung bzw. Freisetzung des PDF-Peptids an den Terminalen verantwortlich sind. Befindet sich das PDF-Färbeintensitäts-

maximum in den Terminalen beim Wildtyp von *D. melanogaster* kurz nach Licht-an, das Minimum kurz nach Licht-aus, verhält es sich bei *Apis mellifera* in diesem Experiment umgekehrt: Das Minimum in den Fasern liegt wie schon bei der Zellanzahl (Abb. 3.1) vier Stunden nach „Licht-an“, das Maximum erstreckt sich mit einem flachen Scheitel von ZT10 bis ZT22, besteht also scheinbar über die gesamte Dunkelphase (für ZT23 und ZT24/0 existieren keine Daten) und beginnt spätestens ab ZT10, zwei Stunden vor „Licht-aus“ (für ZT5 bis ZT9 existieren ebenfalls keine Daten). Aufgrund des weit auseinander liegenden, zeitlichen Rasters bei der Beprobung wurde für eine detailliertere Diskussion der gleiche Versuch mit Sammel- und Stockbienen anhand von sechs Zeitpunkten wiederholt (4.1.2). Die Abweichungen in den Ergebnissen zwischen *D. melanogaster* und *A. mellifera* könnten in der unterschiedlichen Lebensweise der Spezies begründet sein, da die Taufliege dämmerungsaktiv und die Honigbiene, zumindest die sammelnden Tiere, tagaktiv sind.

Bei der Taufliege kommen neben den s-LN<sub>v</sub>s die ebenfalls PDF-exprimierenden l-LN<sub>v</sub>s vor (z. B. Helfrich-Förster, 1997; Helfrich-Förster et al., 2007a), in denen Park et al. (2000) keine zeitlichen PDF-Oszillationen weder in den Zellkörpern noch in den Fortsätzen fanden. Bei der Biene konnten bisher keine Größenklassen unter den PDF-Somata ausfindig gemacht werden (siehe diese Dissertation und Bloch et al., 2003). Zudem folgt die Anordnung der PDF-Zellkörper zueinander keinen ersichtlichen Regelmäßigkeiten und lässt bislang keine räumlichen Einteilungen zu. Überwiegend liegen sie in einem Cluster ballenförmig beieinander. Teilweise ist die Tendenz zu zwei, sehr selten zu drei Clustern oder zu verstreut liegenden Einzelzellen zu erkennen (Abb. 4.2, S. 131). Welche PDF-Neurone in die optischen Loben und welche ins Protocerebrum projizieren, ist bis dato nicht differenziert verfolgbar. Bei den Messungen der PDF-immunreaktiven Färbeintensitäten in den Zellen kamen extrem unterschiedliche Werte heraus, was sich in den großen Fehlerbalken ausdrückt und die fehlende Signifikanz zur Folge haben könnte. Vielleicht existieren wie bei der Taufliege Zellgruppen oder einzelne Zellen mit unterschiedlichen Projektionsrichtungen, die unter Umständen verschiedene PDF-Oszillationen innehaben und die bislang aufgrund des geballten Gefüges nicht differenziert vermessen werden konnten. So gelang es zum Beispiel bei *Musca domestica* die kleinen und großen PDFMe-Neurone den s- und l-LN<sub>v</sub>s aus *D. melanogaster* adäquat gleichzusetzen (Matsushima et al., 2004). In dieser Problematik könnten die großen Fehlerindikatoren bei der Honigbiene ebenfalls begründet sein.



Sammel- und Stockbienen zeigen in ihrer zeitlichen Entwicklung der PDF-Färbeintensität in den PDF-Somata einen ähnlichen, wenn auch nicht signifikanten Ablauf (Abb. 4.4). Sollte PDF bei der Regulation der Lokomotor- oder Sammelaktivität involviert sein, würde man unterschiedliche Oszillationsmuster bei Stock- und Sammelbienen erwarten (anderenfalls könnte PDF auch indirekt oder über weitere Systeme agieren). Beide beinhalten indes ein gemeinsames Minimum, das sich auf einem vergleichbar niedrigen Niveau befindet, und ein über die restlichen drei Zeitpunkte verlaufendes „Hoch“. Das „Hoch“ verläuft jedoch bei den Sammel- sichtlich höher (um etwa 50 Pixel) als bei den Stockbienen. Wie schon bei der Zellanzahl ist der durchschnittliche Wert bei den Stockbienen niedriger als bei den Sammelbienen (Abb. 4.4, rechte Grafik).

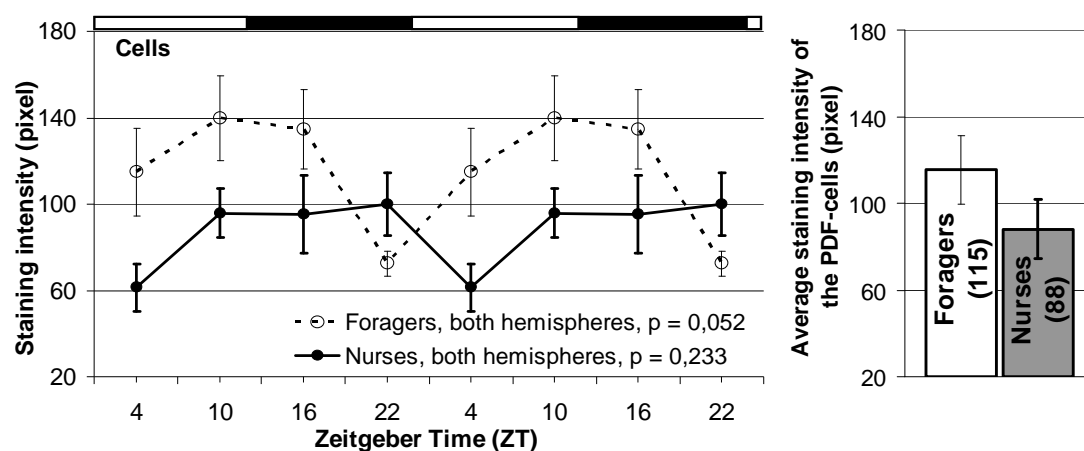


Abb. 4.4: Die Färbeintensitäten der PDF-Somata in Gehirnen von Sammel- („foragers“) und Stockbienen („nurses“) im Verlauf der Zeitgeberzeit anhand von 4 gemessenen Zeitpunkten (linke Grafik) sowie die durchschnittliche PDF-Färbeintensität beider Arbeitergruppen (rechts).

Die sich rhythmisch verhaltenden Sammlerinnen besitzen stets mehr PDF-exprimierende Neurone mit einer höheren PDF-Immunreaktivität in den Somata als die arrhythmischen Stockbienen. Eine Vermutung wäre, dass nicht die Oszillation, sondern z. B. die Anzahl an PDF-exprimierenden Neuronen eine entscheidende Rolle spielt. Einige Studien deuten an, dass die circadianen Wechsel der PDF-Intensität weniger bedeutend in der Verhaltensrhythmizität sind als bislang vermutet (Meelkop et al., 2011). So publizierten z. B. Kula et al. (2006), dass in adulten, transgenen Fliegen (Fliegen, die GFP, das „green fluorescent protein“, unter Kontrolle des *pdf*-Promotors exprimieren) trotz fehlender PDF-Oszillationen normale rhythmische Verhaltensweisen auftraten. Fernández et al. (2008) beobachteten bei *Drosophila* zum Zeitpunkt ZT/CT2 ein komplexeres Verzweigungsmuster der Axone im dorsalen Protocerebrum als zu ZT/CT14.

Des Weiteren konnten Wei et al. (2011) bei der Schabe zeigen, bei der Hamasaka et al. (2005) keine signifikanten PDF-Oszillationen feststellten, dass die PDF-Zellanzahl in Abhängigkeit der Beleuchtungs-Behandlungen unterschiedlich ist (siehe vorne). Zudem wirken sich verschiedene Licht-Dunkel-Verhältnisse nicht auf die Anzahl an kommissuralen

PDF-Fasern, sondern auf deren Länge aus. Längere Fasern in der Schaben-AOC und -POC („*anterior / posterior optic commissure*“) konnten die Forscher unter LD 18:6, nicht aber unter 6:18 vermessen. Diese Resultate zeigen, dass PDF bei der Einstellung auf verschiedene Photoperioden eine Rolle spielen könnte.

Die Diskrepanz zwischen den oben erwähnten Extremen der PDF-Färbeintensitäten in den Zellkörpern ist bei den Sammelbienen mit etwa 70 Pixeln fast doppelt so groß wie bei den Stockbienen mit ungefähren 40 Pixeln (Abb. 4.4). In diesem Zusammenhang ist die hemimetabole *Gryllus bimaculatus* interessant. Im Gegensatz zur Schabe *Leucophaea maderae* (Hamasaka et al., 2005) weist sie signifikante PDF-Oszillationen in ihren PDF-Neuronen auf (Abdelsalam et al., 2008), die unter DD bestehen bleiben und damit vermutlich unter Kontrolle circadianer Schrittmacher stehen (siehe Kapitel 4.1.4). Die Grille ist im Nymphenstadium diurnal und wechselt als adultes Insekt zu einem nocturnalen Verhalten (Tomioka and Chiba, 1982; Abdelsalam et al., 2008). Wie die Schabe besitzt sie in ihren optischen Loben PDF-Neurone in der dorsalen und ventralen Lamina und nahe der Medulla (PDFLa- und PDFMe-Zellen; Abdelsalam et al., 2008). Sieben der 13 bis 14 PDFMe-Neurone sind klein, die restlichen groß. Die kleinen zeigen schwächere Immunreaktivität als die größeren. Die PDF-Oszillationen in den optischen Loben, die als einheitlicher Parameter analysiert wurden, unterscheiden sich kaum beim letzten Nymphenstadium und den Adulten. Während der späten Nacht konnten die Forscher mehr PDF registrieren als während des späten Tages, was auf eine verstärkte Freisetzung des Neuropeptids während des Nachmittags schließen lässt. Die maximalen Konzentrationen finden sich bei beiden Entwicklungsstufen und unter beiden Beleuchtungs-Verhältnissen (LD, DD) bei ZT/CT21, die Minima meist bei ZT/CT6. Unterschiede bestehen in den absoluten Konzentrationen. Bei den adulten nocturnalen Grillen ist die PDF-Konzentration beim Peak unter DD fast doppelt so hoch als unter LD und die Amplitude dementsprechend größer. Beim letzten diurnalen Nymphenstadium jedoch ist die maximale Konzentration unter LD, nicht unter DD höher, wenn auch in dezenterem Ausmaß. Bei der Biene betreffen diese Intensitätsunterschiede allerdings zwei verschiedene Altersgruppen innerhalb des adulten Stadiums, die aber ebenfalls unterschiedliche Verhaltensrhythmen ausprägen (mehr dazu unter 4.1.4).

Der zeitliche Verlauf der PDF-Färbung vor allem in den Gehirnen der Sammlerinnen ähnelt zumindest im Ansatz den unter LD und DD signifikanten Oszillationen der *per*- und *cry*-mRNA (Rubin et al., 2006; Shemesh et al., 2007; Eban-Rothschild and Bloch, 2012). Die niedrigsten Konzentrationen treten am frühen Tag, die bis zu dreimal höheren in der frühen Nacht auf. Diese beiden Moleküle werden in den aufgeführten Studien als die hypothetisch angenommenen negativen Elemente der Rückkopplungsschleife beschrieben

(1.4). Zudem stellten Shemesh et al. (2010) diese Zyklen nur bei diurnal rhythmischen, nicht bzw. deutlich gedämpft bei rund um die Uhr aktiven Bienen fest. Im ersten Experiment dieser Dissertation erweist sich die PDF-Oszillation bei den rhythmischen Sammelbienen als beinahe signifikant ( $p = 0,052$ ), weswegen sie als tendenziell vorhanden betrachtet wird, und die bei den arrhythmischen Stockbienen als nicht signifikant und deutlich gedämpft. Dies könnte als Indiz für die Weitergabe eines endogenen Rhythmus von der Inneren Uhr an weitere Zentren gedeutet werden. PDF würde als circadianes Uhrmolekül von den Schrittmacherneuronen gebildet werden. Dazu müssten aber die PDF-Neurone kolokalisiert sein mit weiteren Uhrmolekülen, bei der Biene beispielsweise mit den mutmaßlichen Uhr-Peptiden PER und CRY, was nicht festgestellt werden konnte (siehe 3.2, S. 81). Die knapp verfehlte Signifikanz und die weit auseinander liegenden Messpunkte machen die Interpretation aber fragwürdig.

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine Rolle im Uhrnetzwerk liegt in den Pteropsin enthaltenden Zellen, die zur Diskussion stehen, als Lichtinput zu fungieren (Velarde et al., 2005). Diese Zellen kommen im gleichen Bereich wie die PDF-Neurone vor. Eine Kolokalisation müsste in weiteren Studien getestet werden.

In Abb. 4.5 auf S. 138 ist der PDF-Färbintensitäts-Verlauf der einzelnen Faserbereiche mit dem der Zellkörper und mit dem Verlauf der Zellanzahl hinterlegt. Jedes Diagramm zeigt prinzipiell eine ähnliche Entwicklung der drei Parameter. Wie bei Park et al. (2000) für die s-LN<sub>s</sub> der Taufliede beschrieben, oszilliert im Bienenhirn PDF signifikant in den Fortsätzen, nicht jedoch in den dazugehörenden Zellkörpern. Bei der Honigbiene wird das Neuropeptid vermutlich in den Varikositäten gespeichert und rhythmisch abgegeben, was sich in den signifikanten Kurven, die die Fasern präsentieren, widerspiegelt. Besonders deutlich zeigen das die Diagramme zu den Stockbienen (linke Spalte). In den Zytoplasmen findet eine nicht signifikante und daher vielleicht als regelmäßig zu bezeichnende PDF-Expression statt, in den Varikositäten dagegen könnte es zur Speicherung (ZT10 bis 22) und schließlich zur rhythmischen Freisetzung (ZT4) kommen, die bei diesen Grafen in Relation zu den Sammelbienen besonders ausgeprägt ausfällt. Eine weitere Hypothese wäre, dass der Transport des PDFs in die Terminalen rhythmisch erfolgt.

Bei den Sammelbienen ist dieser Vorgang ebenfalls, jedoch in dezenterem Ausmaß zu erkennen. Interessanterweise ist bei den älteren Bienen die niedrigste Konzentration in den PDF-Somata bereits zu ZT22 ermittelt worden, in den Fasern allerdings wie üblich zu ZT4. Das könnte für einen eher langsamen Transport des Transmitters von den Zellen zu den Freisetzungsorten an den Fasern bzw. Varikositäten sprechen. Allerdings erlaubt das grobe Zeitraster bei der Beprobung keine präziseren Aussagen über den tatsächlichen Tiefstwert, der sich unter Umständen näher an ZT4 als an ZT22 befinden könnte. Die in

den verschiedenen Faserbereichen ermittelten PDF-Peaks treten überwiegend zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Dieses Phänomen könnte für verschiedene Output-Rhythmen sprechen und wird unter Kapitel 4.1.4 ausführlich behandelt.

Der zeitliche Verlauf der PDF-Färbung in den PDF-Neuriten korreliert bei den Stockbienen grundsätzlich in allen vermessenen Bereichen sowohl mit der PDF-Zellanzahl als auch mit der PDF-Färbeintensität (Korrelationskoeffizient  $r$  von 0,85 bis 0,996; Tab. 4.1). Das trifft für die Sammelbienen nicht zu ( $r$  überwiegend  $< 0,7$ ).

Tab. 4.1: Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammel- und Stockbienen im ersten Experiment

<b>Faserbereich ...</b>	<b>PDF-Zellanzahl</b>		<b>PDF-Färbeintensität (Zytoplasma)</b>	
	<b>Sammel-</b>	<b>Stockbienen</b>	<b>Sammel-</b>	<b>Stockbienen</b>
zwischen v-Lobus / Calyces	0,355	0,989	0,446	0,992
im „median bundle“	0,777	0,996	0,653	0,974
zwischen Zentralgehirn / Lobula	0,964	0,935	0,409	0,974
in der Medulla	0,713	0,856	0,027	0,854
	<b>Sammelbienen</b>		<b>Stockbienen</b>	
PDF-Zellanzahl zu -Färbeintensität	0,200		0,986	

Die sich auf die Stockbienen beziehenden Kurven (Abb. 4.5, S. 138) zeigen zudem einen synchronen Verlauf aller Oszillationen, der bei den Sammelbienen nicht ausgeprägt ist. Bei Letzteren korreliert deutlich nur der Faserbereich „Zentralgehirn/Lobula“ mit der PDF-Zellanzahl ( $r = 0,964$ ); sämtliche Faserbereiche korrelieren dagegen geringer mit der PDF-Färbeintensität (alle  $< 0,7$ ). Dies könnte bedeuten, dass bei Stockbienen ein Grundzustand in der PDF-Oszillation mit immer gleichem Muster vorliegt. Bei Sammelbienen hingegen ändert sie sich aufgabenbedingt. Damit würde es sich bei den diurnalen Bienen um eine Reorganisation der PDF-Oszillationen handeln.

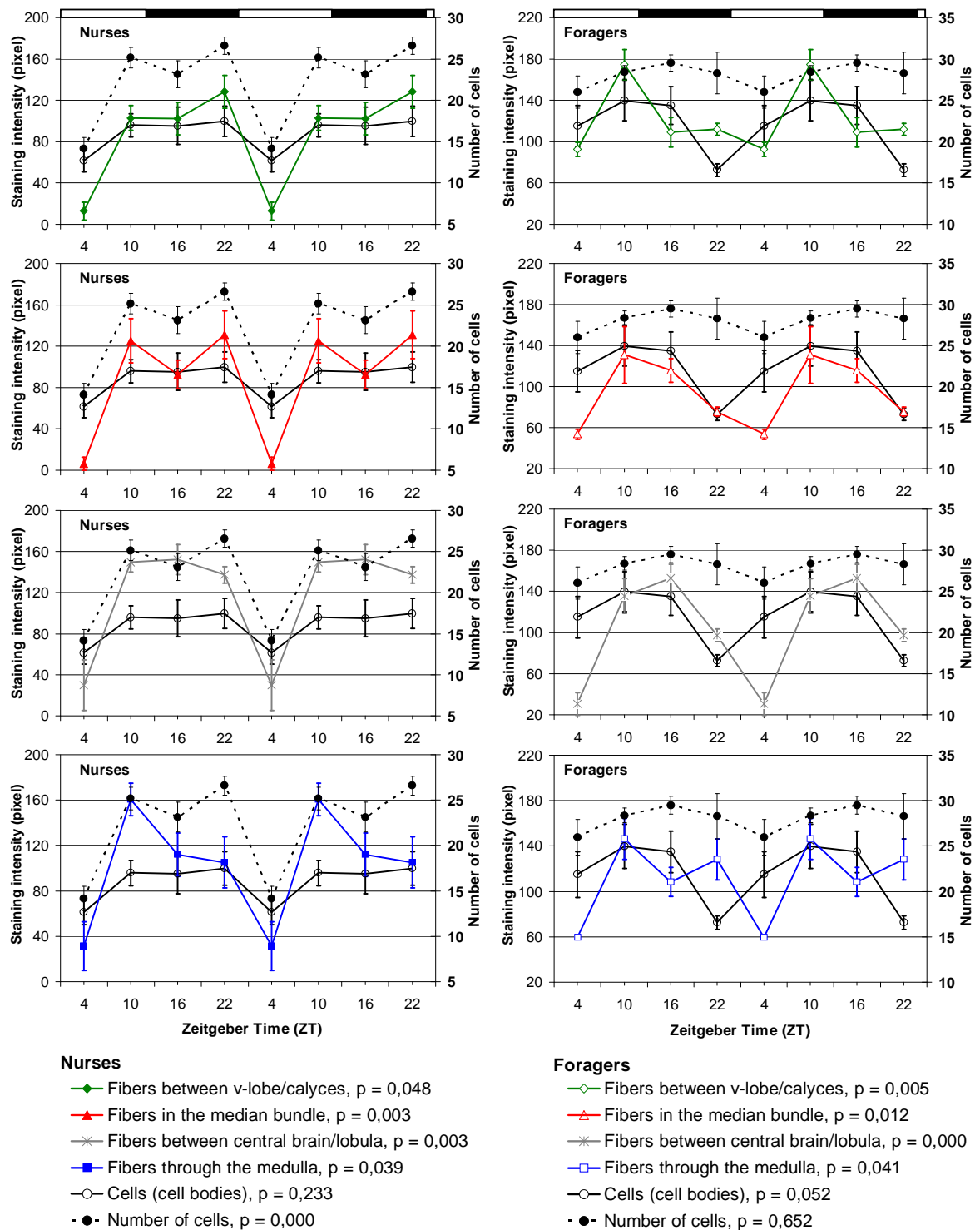


Abb. 4.5: Die Färbintensitäten der PDF-Somata („cells“) und der PDF-Fasern („fibers“) in Gehirnen von Stock- („nurses“, linke Spalte) und Sammelbienen („foragers“, rechte Spalte) im Verlauf von 4 gemessenen Zeitgeber Zeiten (ZT). Jede Grafik zeigt einen Faserbereich, der zusammen mit der dazugehörigen PDF-Färbintensität der Somata sowie deren Anzahl aufgetragen ist.

### 4.1.2 Sammel- und Stockbienen anhand von sechs Zeitpunkten (2. Exp.)

Die Auszählung der PDF-Neurone in den Gehirnen von Sammel- und Stockbienen ergab auch im zweiten Experiment, in dem im Unterschied zum ersten das zeitliche Raster von vier auf sechs zu untersuchende Messpunkte erweitert wurde, rhythmische Oszillationen (Abb. 4.6, linkes Diagramm). Im Gegensatz zum vorherigen Versuch stellen sich nun beide Verläufe – auch der der Sammelbienen – als signifikant heraus ( $p < 0,05$ ).

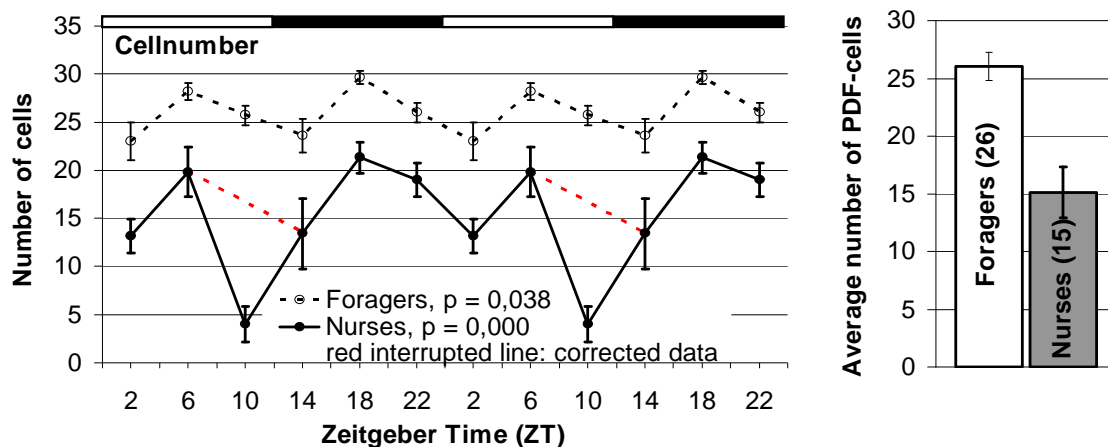


Abb. 4.6: Die Anzahl der PDF-Somata in Gehirnen von Sammel- („foragers“) und Stockbienen („nurses“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit anhand von 6 gemessenen Zeitpunkten (linke Grafik) sowie die durchschnittliche Anzahl bei beiden Arbeitergruppen (rechts). Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Bei den Stockbienen sticht eine eklatante Reduktion der PDF-Zellanzahl bei ZT10 hervor. Der Einschnitt basiert auf Proben, die durch merkwürdige Anomalien wie Löcher im Gewebe, braune Verfärbungen oder grieslig bis klumpig ausgefallener sekundärer Antikörper auffielen (Abb. 4.7, S. 140), weswegen die Richtigkeit dieser Daten infrage gestellt wird. Dabei ist zu beachten, dass zu allen Zeitpunkten der Großteil der Proben derartige Schäden in mehr oder weniger intensiver Ausprägung aufweist. Außergewöhnlich markant sind sie bei ZT10. Lässt man diesen Probenzeitpunkt bei der Auswertung unberücksichtigt, resultiert ein beinahe paralleler Verlauf zu dem Sammelbienenengraf (gestrichelte rote Linie zwischen ZT6 und ZT14 in Abb. 4.6).

Wie schon unter dem ersten Experiment besitzen die Sammelbienen in ihren Gehirnen durchschnittlich mehr PDF-Neurone (26; im ersten Exp. 28) als die Stockbienen (15; korrigiert 17; im ersten Exp. 22), wobei die Diskrepanz dieses Mal gleichmäßig über alle Zeitpunkte – unter Vorbehalt der angenommenen Korrektur – besteht (Abb. 4.6). Der Unterschied beläuft sich auf acht bis zehn Somata in beiden Gehirnhälften zusammen und bekräftigt die in Kapitel 4.1.1 vorgenommene Interpretation, nach der, ähnlich wie bei der

Hummel *Bombus terrestris* (Weiss et al., 2009), rhythmisch sammelnde Tiere mehr PDF-Neurone besitzen als rund um die Uhr im Bienenstock tätige.

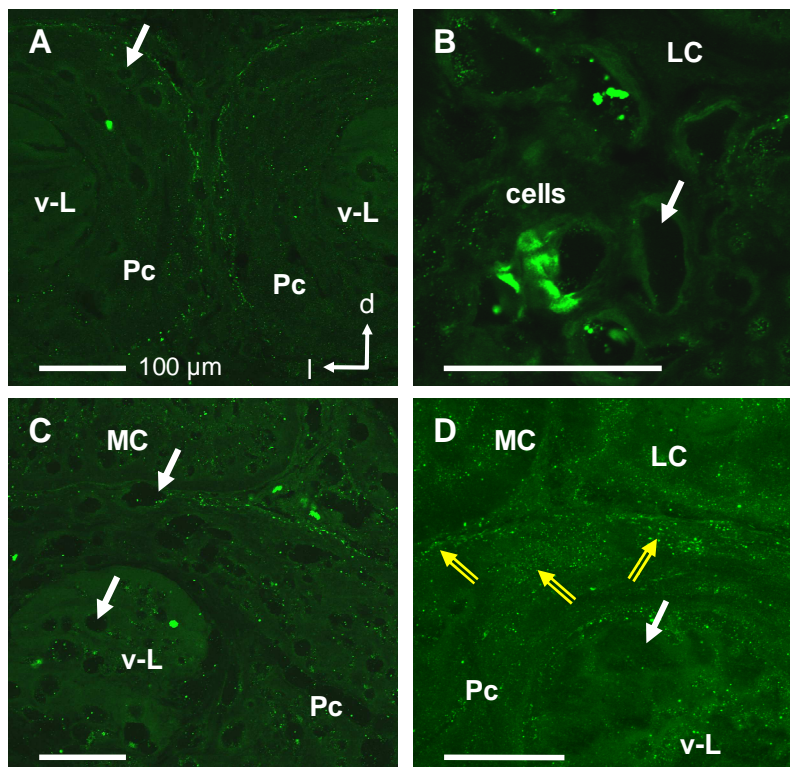


Abb. 4.7: Beispiele für Anomalien in geschädigten Gewebeprobe.

Die Ausschnitte A bis D zeigen in ihrem Gewebe geschädigte Bienengehirne. Diese Proben gingen noch in die Bewertung mit ein, die völlig unbrauchbaren braunen und gänzlich löchrigen Gehirne wurden nicht gescannt.

Die weißen Pfeile deuten exemplarisch auf einige Löcher im Gewebe.

Die gelben Rahmenpfeile weisen auf die Problematik hin, zwischen gefärbten PDF-Neuriten und grißig ausgefallenem sekundärem Antikörper zu differenzieren.

Skalierungsbalken: 100 µm.

**A:** Stockbiene, ZT10, im Bereich „median bundle“; **B:** Sammelbiene, ZT22, auf Höhe der PDF-Zellkörper (linke Hemisphäre); **C:** Sammelbiene, ZT22, PDF-Neuriten zwischen Calyces und v-Lobus (rechte H.); **D:** Stockbiene, ZT10, Ausschnitt analog C. Die in A bis D gleiche Ausrichtung ist in Bild A angegeben.

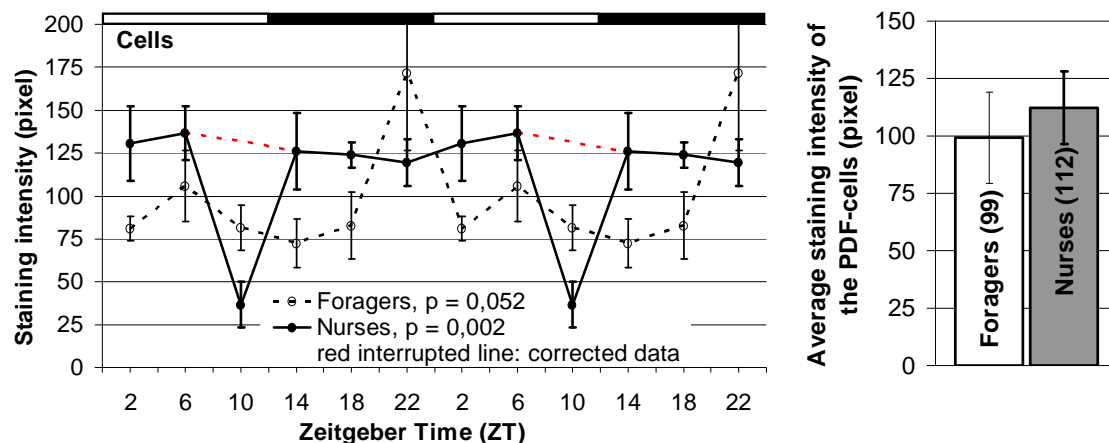


Abb. 4.8: Die PDF-Färbeintensität der PDF-Zytoplasmen („cells“) in Gehirnen von Sammel- („foragers“) und Stockbienen („nurses“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit anhand von 6 gemessenen Zeitpunkten (linke Grafik) sowie die durchschnittliche PDF-Färbeintensität bei beiden Arbeitergruppen (rechte Grafik). Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Die PDF-Färbeintensitäten in den Zellkörpern zeigen in ihrem zeitlichen Verlauf ein gänzlich abgewandeltes Bild (Abb. 4.8, linkes Diagramm). Zunächst existiert der schon bekannte Einschnitt bei ZT10. Betrachtet man den Grafen, der den Sammelbienen zugeordnet wird, fällt ein deutlicher Peak mit einem sehr großen Fehlerbalken bei ZT22 auf.



Diesem Wert liegen nur zwei Proben zugrunde. Die dritte und letzte Probe, die für den Zeitpunkt aus Israel geschickt wurde, zeigt ebenfalls starke Anomalien und wurde deshalb in der Berechnung weggelassen. Wird sie einbezogen, reduziert sich der Wert von 172 auf 123 Pixel und verliert damit wesentlich an Bedeutung (gestrichelter roter Sammelbienenengraf zwischen ZT18 und ZT2). Wird der Fehlerbereich mit  $\pm 23$  Pixeln beispielsweise nach unten einkalkuliert, flacht der Gipfel gänzlich ab und der kleine Peak bei ZT6 wird zum Höchstwert, der allerdings gleichfalls einen großen Fehlerbereich aufweist. Aufgrund der mutmaßlichen Artefakte und potenziellen Korrekturen nähern sich die beiden Kurven (Stock- und Sammelbienen) an und ähneln sich zunehmend in ihrem Verlauf. Damit würde es keine bedeutsamen Unterschiede in der Oszillation der PDF-Färbintensität, wie schon bei der PDF-Zellanzahl, zwischen Stock- und Sammelbienenneuronen geben, mit der Ausnahme der absoluten Zahlenwerte und der Amplitude.

Der durchschnittliche Pixelwert für die PDF-Färbintensität der PDF-Zellkörper liegt im zweiten Experiment bei den Stockbienen höher als bei den Sammelbienen, wobei sich der Fehlerbereich überschneidet (Säulendiagramm in Abb. 4.8). In der korrigierten Version erweitert sich die Diskrepanz und die Daten reichen von 91 Pixel für die Sammel- bis 126 Pixel für die Stockbienen (kein Säulendiagramm abgebildet).

Die Amplituden der Oszillationen sind bei der Zellanzahl (Abb. 4.6, S. 139) sogar mit möglicher Korrektur beim Stockbienenengraf – wenn auch geringfügig – größer (wie im ersten Experiment, Abb. 4.1, S. 128) und bei der PDF-Färbintensität (Abb. 4.8) beim Sammelbienenengraf ausgeprägter (ebenfalls wie im ersten Experiment, Abb. 4.4, S. 134).

Die Auftragungen der Ergebnisse aus dem ersten Experiment mit vier Messzeitpunkten und derjenigen aus dem zweiten Experiment mit sechs Messzeitpunkten in einem Diagramm mit einer gemeinsamen, fortlaufenden Zeitachse zeigen teilweise übereinstimmende, teilweise konträre Verhältnisse (Abb. 4.9 und Abb. 4.10 auf S. 143). Vergleicht man nun für die Sammelbienen den zeitlichen Fortlauf der PDF-Zellanzahl (rote Grafen in Abb. 4.9), bestätigt sich das zunächst bei ZT4 ermittelte Minimum, das im zweiten Experiment zeitlich näher an „Licht-an“ bis ZT2 vorrückt. Das absolute Maximum wird im zweiten Versuch bei ZT18 erfasst, das somit nahe ZT16 aus dem ersten Versuch bestehen bleibt. Erstreckte sich der flache Peak aus dem ersten Experiment über drei Zeitpunkte (ZT10 bis ZT22), wird der neue Graf von einem Einschnitt zu einem weiteren niedrigen, beinahe zum Minimum von ZT2 hinunterreichenden Wert bei ZT14, also zwei Stunden nach „Licht-aus“, geprägt. Das engere Zeitraster des zweiten Experiments offenbart eine unter vier Zeitpunkten nicht erfasste Schwingung. Gleichzeitig präzisiert sie die bereits entdeckten Höchst- und Tiefstwerte. Das neue Ergebnis präsentiert einen aus zwei Gipfeln – bei ZT6 und ZT18 – bestehenden Grafen, der sich im Gegensatz zum vorherigen als

signifikant herausstellt. Stets im Anschluss an den Wechsel der Lichtverhältnisse erreicht die Anzahl der PDF-Neurone einen minimalen Wert und während der mittleren Hell- bzw. Dunkelphase einen maximalen. Immer zu Zeiten eines Lichtwechsels verringert sich die Anzahl der PDF-exprimierenden Neurone, um anschließend während des Tages oder der Nacht wieder auf ein Hoch anzusteigen. Diese Tatsache erinnert an die von Petri und Stengl (1997) durchgeführten PDF-Injektionsversuche mit der Schabe *Leucophaea maderae*. In ihrer Veröffentlichung äußern sie die Vermutung, dass PDF zu Zeiten geringen Lichteinflusses in den Licht-Input integriert ist oder als nicht-photischer Input agiert. Der schlechte Zustand der Bienenwebeprobe schmäler jedoch die Zuverlässigkeit dieser Interpretationen.

Anders als im ersten Experiment mit vier Messzeitpunkten erscheint im zweiten Experiment mit sechs Messzeitpunkten die höchste PDF-Färbeintensität in den PDF-Zellkörpern der Sammelbienenneurone (schwarze Grafen in Abb. 4.9) nicht bei ZT10, sondern zwei Stunden vor „Licht-an“ bei ZT22. Dort befand sich im ersten Versuch das Minimum. Der Maximalwert beruht allerdings, wie bereits erklärt, auf zwei anzweifelbaren Proben. Nach der spekulativen Korrektur (verbildlicht in Abb. 4.8 auf S. 140) löst der Peak bei ZT6 als neuer Höchstwert den ehemals bei ZT22 befindlichen ab und liegt damit deutlich näher beim Maximum aus dem ersten Versuch bei ZT10. Für eine definitive Aussage wären jedoch mehr und vor allem ungeschädigte Proben pro Zeitpunkt notwendig.

Im zweiten Experiment senkt sich der Graf direkt im Anschluss an den eklatanten Peak bei ZT22 kurz nach „Licht-an“ zu ZT2 auf einen vergleichbar niedrigen Wert wie vor dem Gipfel bei ZT18. Die Kurven aus beiden Experimenten verlaufen zwischen ZT2 und ZT6 kurzzeitig parallel. Nach ZT6 zog sich ursprünglich ein flacher Peak über ZT10 und ZT16 entlang, im neuen Versuch bleibt der Graf bis ZT18 auf einem sehr niedrigen Niveau.

Auch für die Stockbienen wurden das erste und zweite Experiment mit vier und sechs Zeitpunkten zusammengefasst (Abb. 4.10, S. 143). Da sich die Grafen zur Zellanzahl und zur Färbeintensität wegen der Skalierung mehrfach überkreuzten, sind die zu vergleichenden Kurven in jeweils einem eigenen Diagramm direkt untereinander dargestellt. Bei den Grafen, die auf sechs Messpunkten basieren, sticht wieder ZT10 ins Auge. Lässt man wie erläutert den kritischen Datenpunkt unbeachtet (der mutmaßlich korrigierte Verlauf der Grafen ist in Abb. 4.6, S. 139 und Abb. 4.8, S. 140 veranschaulicht), gleichen sich die Verläufe hinsichtlich vier und sechs Messpunkte zunehmend an.

Ergab die Auswertung der zeitabhängigen Anzahl an PDF-Neuronen (rote Grafen) mit vier Zeitpunkten eine eingipfelige Oszillation mit einem flachen Peak von ZT10 bis ZT22 und einem deutlichen Minimum bei ZT4, schiebt sich bei der sechs Zeitpunkte-Analyse ein zusätzlicher Minimalwert bei ZT14 dazwischen. Wie schon bei den Sammelbienen beobach-

tet, zeigt der Verlauf der Zellanzahl in Abhängigkeit der Zeit eine zweigipfelige Oszillation. Die Maxima befinden sich ebenfalls bei ZT6 und ZT18.

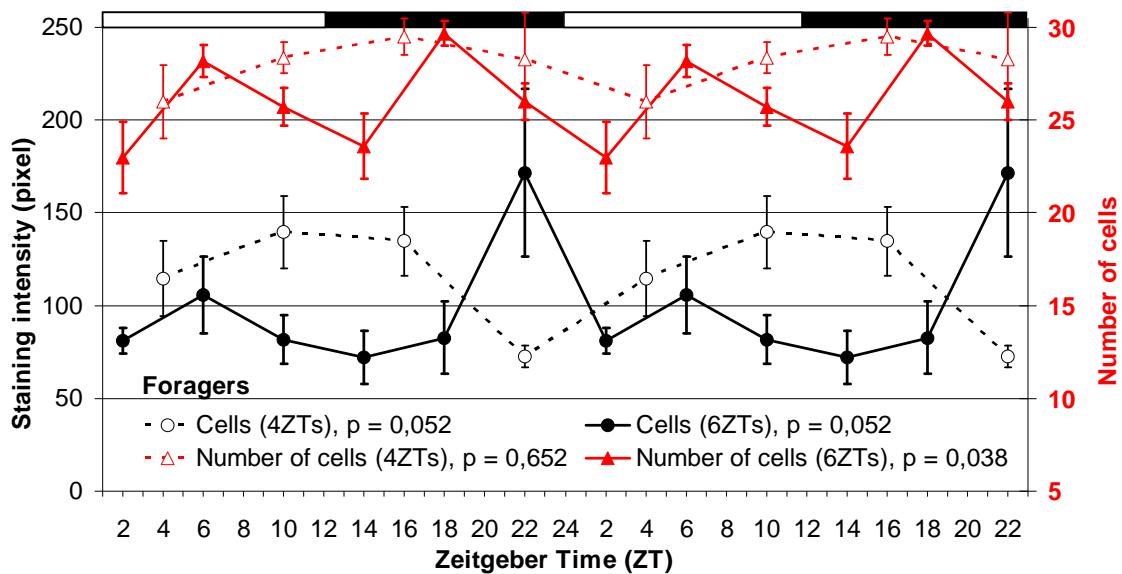


Abb. 4.9: Die Anzahl (rote Grafen) und die PDF-Färbintensitäten (schwarze Grafen) der PDF-Somata in Gehirnen von Sammelbienen („foragers“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit (ZT) anhand von 4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 2) gemessenen Zeitpunkten.

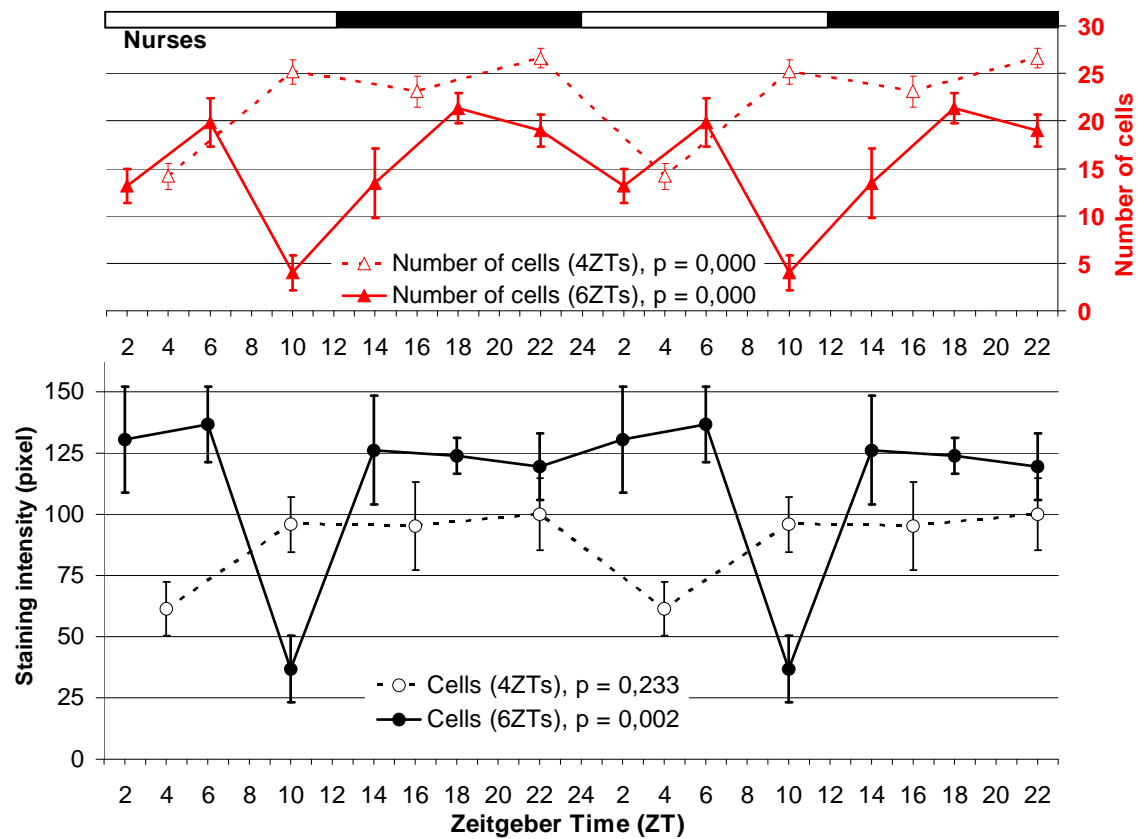


Abb. 4.10: Die Anzahl (oberes Diagramm) und die PDF-Färbintensitäten der PDF-Somata (unteres Diagramm) in Gehirnen von Stockbienen („nurses“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit (ZT) anhand von 4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 2) gemessenen Zeitpunkten.

Bei den Kurven zur PDF-Färbeintensität der PDF-Zellkörper in den Gehirnen der Stockbienen anhand vier und sechs vermessener Zeitpunkte (schwarze Grafen) erkennt man bei beiden eine Oszillation, jedoch sind die Fehlerbereiche zu groß, als dass von bedeutsamen Schwingungen geredet werden könnte – unter der Annahme des Artefakts bei ZT10. Der Tiefstwert im ersten Experiment lag bei ZT4, im zweiten liegt er zeitlich nach vorne versetzt bei ZT22. Bei diesem Zeitpunkt war bei den Sammelbienen im ersten Versuch das Minimum verzeichnet worden (Abb. 4.4, S. 134). Der Höchstwert beim Stockbienenengraf im zweiten Experiment befindet sich nun bei ZT6, kann aber wegen des zweifelhaften Datenpunktes bei ZT10 nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Auswertung der PDF-Färbeintensitäten in den PDF-Neuriten führte zu einem sehr problematischen Sachverhalt, da die Höhe der Werte aus unerklärlichen Gründen auf maximalen Pixelintensitäten beruhten, die sich je nach Hintergrundfärbung reduzierten (2.7.1.2, S. 47). Eine abgewandelte Vermessung („squares 5x5 pixel“) ergab im Wesentlichen ähnliche Resultate. Der einzige bei Stock- wie Sammelbienen signifikante Faserbereich liegt zwischen Zentralgehirn und Lobula (S. 145, Abb. 4.11, dritte Zeile von oben). Auf einen Vergleich der Daten untereinander und mit dem früheren Experiment wird wegen der Gewebeschäden und der Problematik bei der Auswertung verzichtet. Beispielsweise können wegen der Gewebeschäden und damit fehlender Datenpunkte keine expliziten Angaben über mögliche Peaks gemacht werden. Die PDF-Oszillationen wurden bezüglich ihrer Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) trotzdem verglichen (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammel- und Stockbienen im zweiten Experiment

<b>Faserbereich ...</b>	<b>PDF-Zellanzahl</b>		<b>PDF-Färbeintensität (Zytoplasma)</b>	
	<b>Sammel-</b>	<b>Stockbienen</b>	<b>Sammel-</b>	<b>Stockbienen</b>
zwischen v-Lobus / Calyces	0,319	0,960	0,253	0,915
im „median bundle“	0,012	0,777	-0,208	0,909
zwischen Zentralgehirn / Lobula	0,873	0,966	0,378	0,932
in der Medulla	0,352	0,930	-0,449	0,871
	<b>Sammelbienen</b>		<b>Stockbienen</b>	
PDF-Zellanzahl zu -Färbeintensität	0,164		0,828	

Interessanterweise korrelieren auch im zweiten Experiment sämtliche Bereiche in den Gehirnen der Stockbienen untereinander mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,777 und 0,966, während bei den Sammelbienen wiederholt nur zwischen dem Faserbereich Zentralgehirn/Lobula und der PDF-Zellanzahl eine solche festzustellen ist.

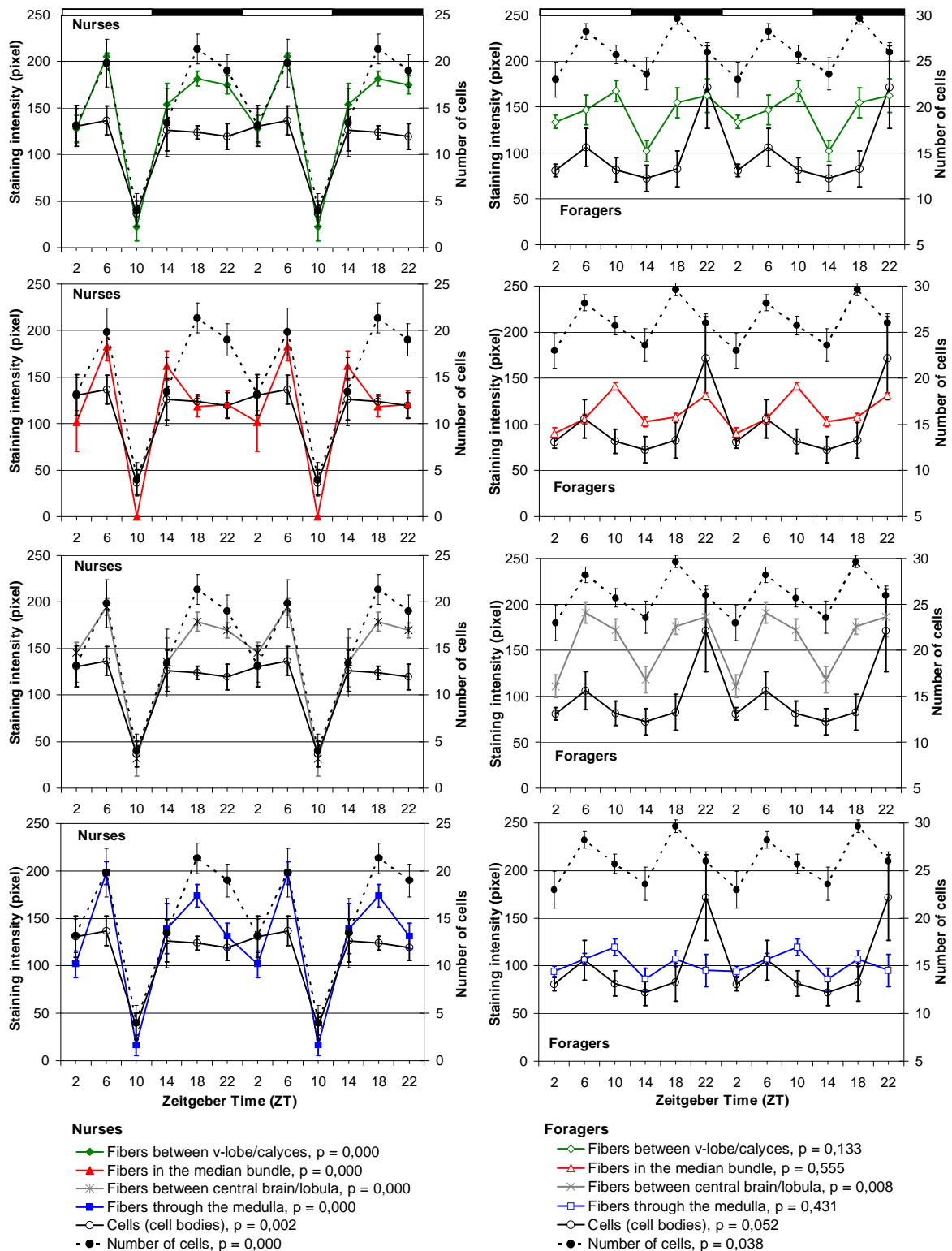


Abb. 4.11: Die Färbeintensitäten der PDF-Neuriten (basierend auf der Auswertung mittels „squares 5x5 pixel“) in unterschiedlichen Bereichen der Gehirne von Stock- („nurses“, linke Spalte) und Sammelbienen („foragers“, rechte Spalte) im Verlauf der Zeitgeber Zeit anhand von 6 analysierten Zeitpunkten. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Auch in den Diagrammen (Abb. 4.11) ist wie im ersten Experiment der synchrone Verlauf aller Oszillationen bei den Stockbienen (linke Spalte) und die fehlende Synchronität der Oszillationen bei den Sammelbienen (rechte Spalte) sichtbar. Dieses Ergebnis unterstützt

die unter Kapitel 4.1.1 erfolgte Interpretation, nach der sich bei den Stockbienen die PDF-Oszillationen in einem Grundzustand synchron verhalten, während sie sich bei Sammelbienen reorganisieren und vielleicht aufgabenbedingt ändern.

#### 4.1.3 Wiederholung: Sammelbienen unter LD (3. Exp.)

Das zweite Experiment lieferte aufgrund der Schäden in den Gewebeproben keine vertrauenswürdigen Ergebnisse (vgl. vorheriges Kapitel). Besonders bei den Sammelbienen zeigten sich in den diversen Faserbereichen große Abweichungen in den einzelnen Oszillationen. Daher wurde der Versuch mit Sammelbienen aus Regensburg wiederholt. Die Tiere wurden, dieses Mal im Anschluss an ein Entrainment im Inkubator (LD 12:12), wieder alle vier Stunden untersucht, wobei acht Individuen pro Messpunkt für fundiertere Resultate sorgten.

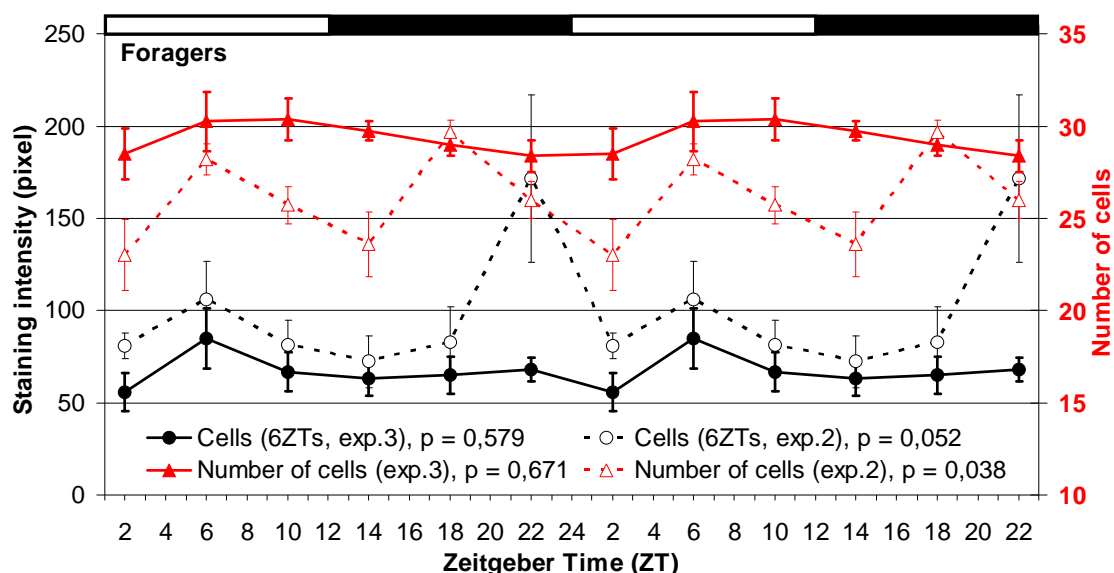


Abb. 4.12: Die Anzahl (rote Grafen) und die PDF-Färbeintensitäten (schwarz) der PDF-Somata in Gehirnen von Sammelbienen („foragers“) im Verlauf der Zeitgeber Zeit (ZT). Aufgetragen sind die Ergebnisse aus dem zweiten (gestrichelte Linien) und dem dritten Experiment (durchgezogene Linien). Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

In Abb. 4.12 sind die Zellanzahl und die Färbeintensität des Zytoplasmas der PDF-Neurone in Abhängigkeit der Zeit sowohl für das fragwürdige zweite als auch für das dritte Experiment aufgetragen. Ein Vergleich muss kritisch betrachtet werden, da die Herkunft und Haltung der Tiere voneinander abweichen. Unterschiede in den Ergebnissen könnten daher auch in einer Varianz der Tierkolonien oder der zeitlich getrennten Färbeprotokolle liegen.

Die für den grafischen Verlauf der PDF-Färbeintensität in den Zellkörpern in Erwägung gezogenen Korrekturen, die unter Kapitel 4.1.2 angedeutet und in Abb. 4.8 auf S. 140 verbildlicht wurden, stellen sich als zutreffend heraus (schwarze Grafen in Abb. 4.12). Der



Tiefstwert rückt – wie schon beim Vergleich des ersten Versuchs mit dem zweiten – nahe an Licht-an bei ZT2 heran. Der zweifelhafte Peak bei ZT22 aus dem zweiten Experiment verschwindet vollends, den „neuen“ Höchstwert liefert der Datenpunkt bei ZT6. Allerdings sind die Verläufe des dritten Experiments nicht signifikant und die absoluten Pixelwerte zu allen Zeitpunkten geringer. Letzteres liegt vermutlich an der niedrigeren Antikörperkonzentration (2.5.1.1).

Der Graf zur PDF-Zellanzahl (Abb. 4.12, rote, durchgezogene Linie) erinnert an das erste Experiment mit vier Zeitpunkten (vgl. Abb. 4.1, S. 128) und unterstützt den Verdacht, dass es sich beim zweiten Experiment um fehlerhafte Werte handelt. Das Minimum reicht von ZT22 bis ZT2 (im ersten Versuch lag es bei ZT4, im zweiten gleichfalls bei ZT2), gefolgt vom Maximum, das sich von ZT6 bis ZT10 erstreckt (im ersten Versuch von ZT10 bis ZT22, wobei ZT16 den Scheitel darstellte, im zweiten Versuch ZT6 und zusätzlich ZT18). Während des Wechsels von Hell nach Dunkel verringert sich die zuvor maximale Zellanzahl und nimmt kontinuierlich bis zum minimalen Wert am Ende der Nacht und beim Wechsel von Dunkel nach Hell ab. Damit ähnelt der zeitliche Fortgang der Zellanzahl dem der PDF-Färbeintensität. Die Anzahl der PDF-Zellen verändert sich tendenziell in Phasen des Lichtwechsels. Wie im ersten Experiment scheint Licht-an einen hemmenden Effekt auszuüben. Wenn auch der ANOVA-Test keine Signifikanz beim Sammlerinnengraf errechnete, so ist doch zumindest die Tendenz einer Oszillation mit dem wie bei den Stockbienen gleich platzierten Tiefstwert zu erkennen.

Im Durchschnitt wurden im dritten Experiment 29 PDF-Neurone ermittelt, was mit den 28 Somata aus dem ersten Versuch zusammenpasst. Es bekräftigt, dass Sammelbienen, die dem Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt sind und sich rhythmisch verhalten, mehr PDF-Neurone besitzen als Stockbienen, die rund um die Uhr im dunklen Bienenstock tätig sind, und untermauert die im ersten Kapitel erfolgte Interpretation.

Das dritte Experiment bestätigt die nicht vorhandenen Korrelationen (alle deutlich  $< 0,7$ ) zwischen den verschiedenen PDF-Oszillationen in Sammelbienen Gehirnen (Tab. 4.3, S. 149). Im Gegensatz zu Stockbienen, bei denen eine Synchronität aller Oszillationen zueinander festgestellt worden war (Abb. 4.5, S. 138), zeigen die Sammelbienen differenzierte und untereinander nicht synchrone Verlaufsmuster (siehe Abb. 4.13, S. 148). Somit wird das erste Experiment (und sogar das zweite) in seiner Aussage bestätigt. Es könnte ein Hinweis sein, dass Sammelbienen komplexere Aufgaben erfüllen müssen und daher unterschiedliche Signale in verschiedene Gehirnregionen schicken müssen.

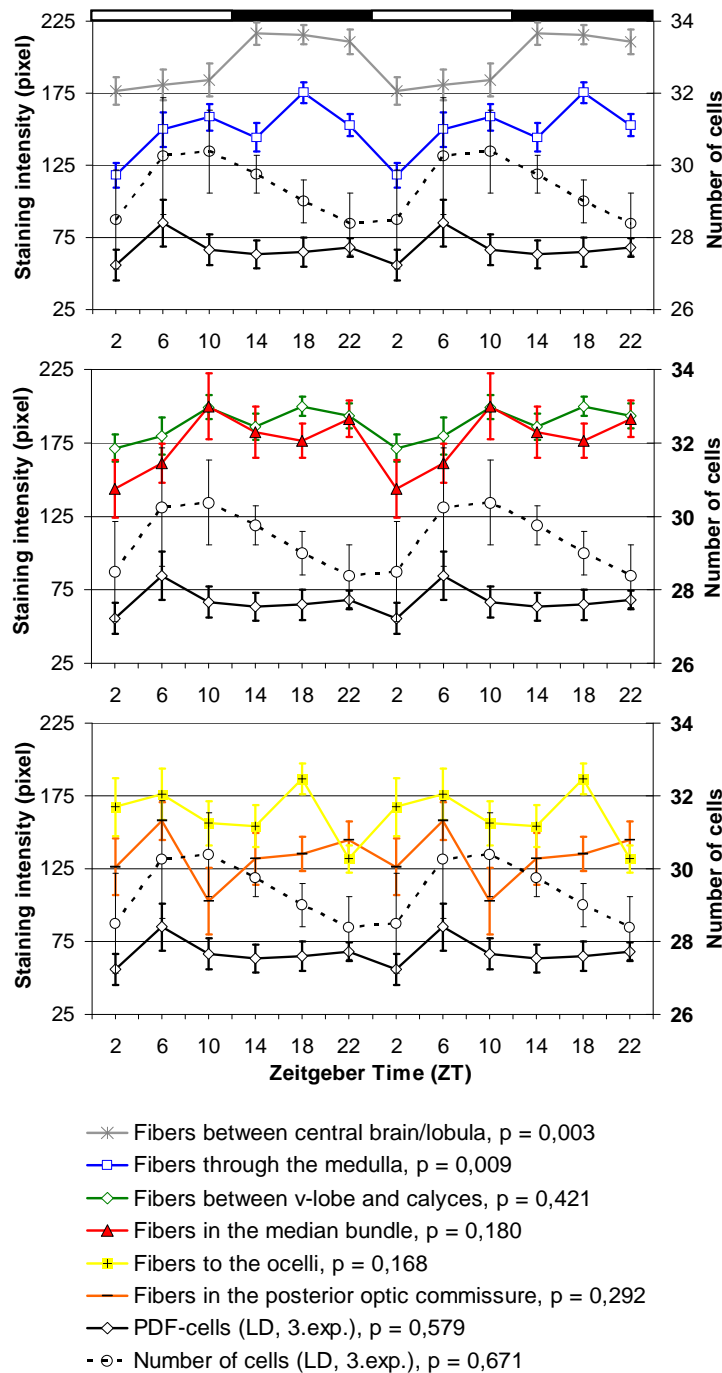


Abb. 4.13: Die PDF-Färbeintensitäten in den diversen Faserbereichen verglichen mit den Oszillationen in den Zytoplasmen der PDF-Somata („PDF-cells“) und in der PDF-Zellanzahl („Number of cells“) im Sammelbienenhirn aufgetragen gegen die Zeitgeber Zeit (ZT) unter LD 12:12. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Die meisten PDF-Neuriten zeigen die Neigung, während der Nacht stärker gefärbt zu sein als während des Tages. Das betrifft insbesondere die Fasern zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula („centralbrain / lobula“, grauer Graf, Abb. 4.13), in der Medulla (blau), zwischen dem v-Lobus und den Calyces (grün), sowie im „median bundle“ (rot). Das könnte dafür sprechen, dass PDF nachts in den Varikositäten angereichert und gespeichert wird. Bei allen vier Grafen stimmt das Minimum bei ZT2 überein, was sich als konform mit dem ersten Experiment erweist, in dem die schwächste PDF-Färbung bei ZT4 registriert wurde. Vielleicht kommt es beim Wechsel von Dunkel nach Hell zu einer intensiven Freisetzung des Neuropeptids. So berichten Miśkiewicz et al. (2008), dass im Gehirn von *Musca domestica* eine Stunde nach Licht-an weniger PDF-speichernde DCVs („dense core vesicles“) in den Varikositäten sichtbar sind als eine Stunde nach Licht-aus.

Dieses Phänomen ist auf die Grafen, die die PDF-Färbeintensitäten in den Neuriten der Honigbiene darstellen, zeitlich übertragbar.

Ein Vergleich aller PDF-Oszillationen bei Sammelbienen aus dem ersten Experiment mit vier Messpunkten mit denen aus dem dritten Experiment mit sechs Messpunkten zeigt

überwiegend ähnliche Verläufe (Abb. 4.14, S. 150). Ansatzweise parallel sind sie in drei Faserbereichen: im „*median bundle*“, zwischen Zentralgehirn und Lobula sowie in der Medulla. Die Abweichungen liegen vermutlich in der unterschiedlichen Herkunft der Kolonien aus Israel und Regensburg und in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen während der Versuche.

Tab. 4.3: Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammelbienen im dritten Experiment

<b>Faserbereich ...</b>	<b>PDF-Zellanzahl</b>	<b>PDF-Färbeintensität (Zytoplasma)</b>
zwischen v-Lobus und Calyces	0,159	0,042
im „ <i>median bundle</i> “	0,288	0,085
zwischen Zentralgehirn und Lobula	-0,275	-0,163
in der Medulla	0,265	0,363
in den ocellaren Trakten	0,233	0,143
in der POC	-0,195	0,605
PDF-Zellanzahl		0,558

Im ersten Experiment stellten sich die PDF-Oszillationen in allen Faserbereichen als signifikant heraus (vgl. Abb. 3.1, S. 66), wiederum signifikant sind hingegen nur zwei, der zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula (Abb. 4.13, S. 148, grauer Graf,  $p = 0,003$ ) sowie der in der Medulla (blau,  $p = 0,009$ ). Dagegen finden sich in den PDF-Neuronen – wie im ersten Experiment – keine signifikanten Oszillationen. Jedoch bleibt der Tiefstwert am frühen Morgen. Hier erhärtet sich der Verdacht, dass das Licht eine zunächst hemmende Wirkung auf PDF hat, was sich sowohl in den Zytoplasmen als auch in der Zellanzahl auswirkt. Zudem könnte das bedeuten, dass PDF in den frühen Morgenstunden an der Zelle selbst freigesetzt wird und daher auch autokrin wirkt. Die Verteilungen der PDF-Rezeptoren bei der Honigbiene sind bis jetzt unerforscht. Bei *Drosophila melanogaster* wurden PDF-Rezeptoren auch auf den PDF-exprimierenden s-LN<sub>s</sub> selbst beschrieben (Im and Taghert, 2010).

In der Abb. 4.13 lässt sich die Tendenz erkennen, nach der am Tag mehr PDF-Zellen mit einer höheren PDF-Färbeintensität der Zellkörper gefärbt sind als in der Nacht. Beide Parameter verlaufen zeitlich versetzt zu den signifikanten Faserbereichen (obere Grafik), sie sind höher, wenn in den Fasern eine niedrige PDF-Konzentration herrscht. Es sieht danach aus, dass in der zweiten Tageshälfte von vielen Zellen verstärkt PDF gebildet, gleichzeitig aber an den Zielorten freigesetzt wird; in der Nacht dagegen von einer geringeren Anzahl an Zellen weniger PDF produziert und zugleich in den Varikositäten gespeichert wird.

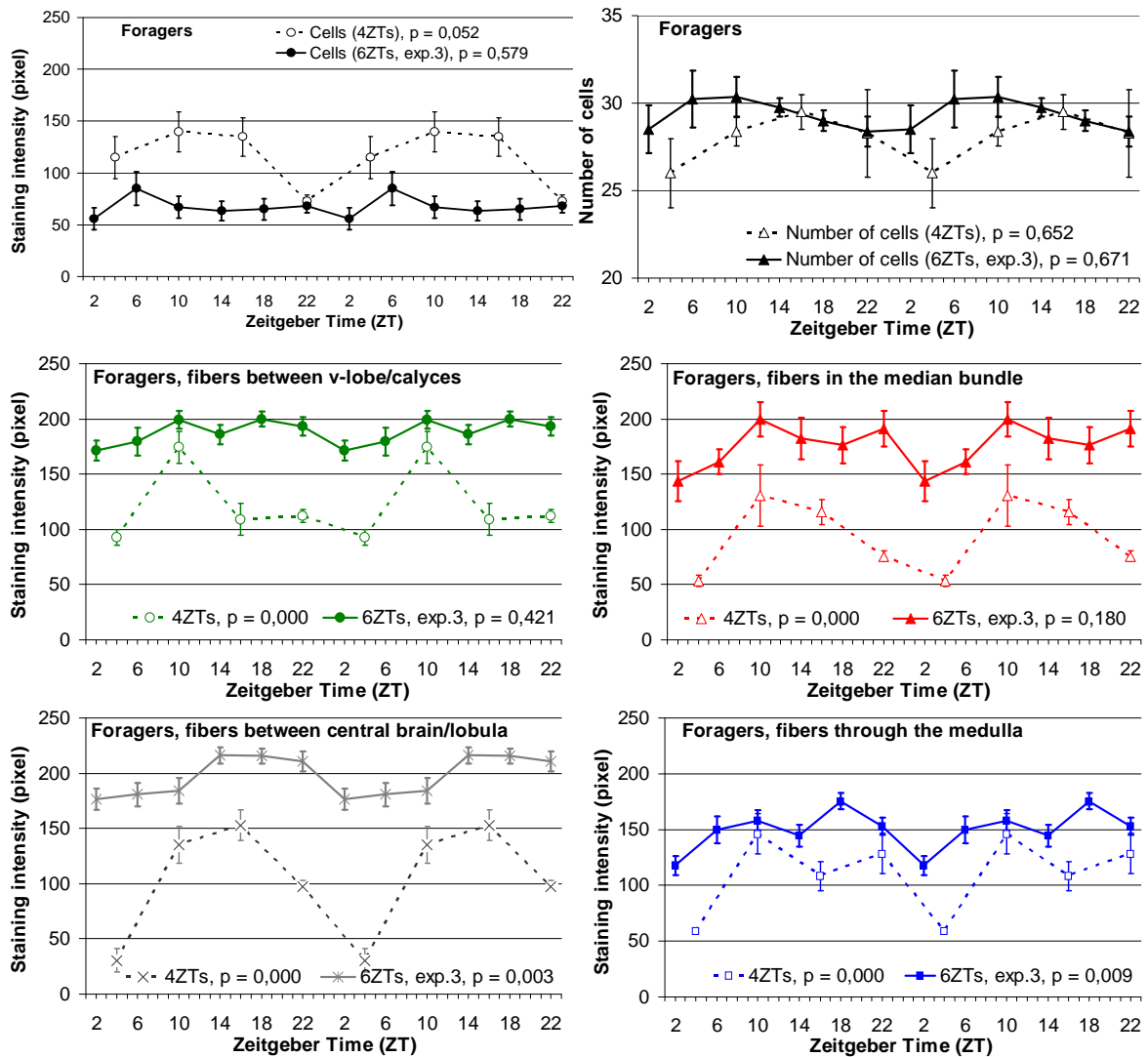


Abb. 4.14: Die PDF-Färbeintensitäten im Zytoplasma („cells“) und in den Fasern („fibers“) und die PDF-Zellanzahl aufgetragen gegen die Zeitgeber Zeit (ZT) unter LD 12:12 anhand von 4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 3) gemessenen Zeitpunkten im Sammelbienen Gehirn. Die Fehlerbalken entsprechen dem SE („standard error of mean“).

Das dritte Experiment festigt die Ansicht, dass, wie bei Park et al. (2000) für die Taufliège beschrieben, keine signifikante PDF-Oszillation in den Zytoplasmen der Zellkörper, wohl aber in bestimmten Terminalen der PDF-Neuriten stattfindet (vgl. 4.1.1). Nach den Resultaten des dritten Versuchs zu urteilen, beschränkt sich diese bei der Honigbiene auf zwei Gehirnbereiche: den „Loop“ und die Fasern in der Medulla. Das steht im Widerspruch zu den Projektionsverhältnissen bei der Taufliège, bei der die signifikanten Oszillationen in den Terminalen der s-LN<sub>v</sub>s, die ins dorsale Gehirn projizieren, zu finden sind und nicht in den l-LN<sub>v</sub>s, deren Fasern sich T-förmig aufspaltend in die ipsilaterale Medulla und über den POT (posteriorer optischer Trakt) in den kontralateralen optischen Lobus verzweigen (Helfrich-Förster et al., 2007a). Bei der Honigbiene scheinen sich von dem PDF-Zellcluster Neuriten direkt in die Medulla zu verzweigen (Abb. 4.2, E, S. 131 und Kapitel 3.3.4.3.1 „PDF-Neuriten in der Medulla“, S. 99). Ob diese Fasern mit einem zweiten Ast wie bei

*D. melanogaster* beschrieben in Richtung kontralateral über die POC (C für „*commissure*“; bei der Tauf liege POT) laufen, ist nicht verfolgbar, aber durchaus anzunehmen. Nach Helfrich-Förster et al. (2007a) könnte die Hauptfunktion der I-LN<sub>v</sub>s im Rhythmustransfer zu den optischen Loben liegen, was an die Rolle des PDHs in Crustaceen erinnert, wo über die rhythmische Wanderung der Schirmpigmente die Tag-Nacht-Sensitivität der Augen eingestellt wird (Rao, 1992). Zyklische Tag-Nacht-Fluktuationen in Bezug auf den Axondurchmesser in den Lamina-Monopolaren, auf die Synapsenanzahl in den Photorezeptor-terminalen (Meinertzhagen and Pyza, 1999) und auf die Wanderung der Schirmpigmente (Pyza and Meinertzhagen, 1997b) finden sich bei *M. domestica* und auch *D. melanogaster*. Diese Zyklen scheinen gemäß den Veröffentlichungen unter anderem durch PDF vermittelt zu werden, sind circadian und werden zudem von Licht direkt beeinflusst. Die Zeitangaben zur rhythmischen Ausschüttung des PDFs an den Varikositäten in der distalen Medulla von *M. domestica* (Miśkiewicz et al., 2008) sind identisch zu den signifikanten Verläufen in den zwei Faserbereichen bei der Honigbiene. Die Forscher fanden in der Fliegen-Medulla eine Stunde nach Licht-an weniger DCVs als eine Stunde nach Licht-aus (siehe vorne). Experimentell lösten sie die parakrine Freisetzung über Depolarisationen aus. Diese Argumente, die PDF-Oszillationen und die Projektionsgebiete im Gehirn der Honigbiene sprechen dafür, dass PDF bei der zyklischen Sensitivitätseinstellung der Komplexaugen mit eine Rolle spielen könnte.

Der „Loop“ zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula stellt ein dickes Bündel aus Fasern dar (3.3.4.2, S. 93). In dieses Bündel hinein und aus ihm heraus ziehen zahlreiche Fortsätze. Eindeutig hinein projizieren Neuriten, die von den ipsilateralen PDF-Zellkörpern stammen. Über den „Loop“ setzen sie sich unter anderem in der POC fort, in der sie beide Hemisphären überbrücken. Kontralateral scheinen sich die Fasern über den dortigen „Loop“ in die Medulla, in der sie sich weitflächig auffächern, und in den posterioren Bereich des Protocerebrums aufzugabeln (vgl. Kapitel 4.3.3 auf S. 170). Der „Loop“ selbst führt also Fortsätze, die kein gemeinsames Ziel haben und gleicht einem intensiven Kreuzungsbereich. Eine signifikante PDF-Oszillation im „Loop“ spricht für eine Synchronisation beider Hemisphären. Innerhalb der POC finden sich jedoch keine signifikanten PDF-Oszillationen (Abb. 3.3, S. 72, Diagramm „*Fibers*“, oranger Graf), was an den gegenläufigen Projektionsrichtungen liegen könnte. Außerdem könnte das für eine rhythmische Freisetzung des Neuropeptids insbesondere im Kreuzungsbereich selbst sprechen und auf die eventuelle Bedeutung desselben hinweisen. Das Umfeld dieses Bereichs wird bei der Honigbiene von Bloch et al. (2003) und bei der Hummel von Weiss et al. (2009) vorsichtig als akzessorische Medulla bezeichnet (ausführliche Diskussion in Kapitel 4.3.1 „Die PDF-Somata und eine mögliche akzessorische Medulla“, S. 159). Diese gilt bei vielen

Insekten als Zentrum circadianer Schrittmacher (z. B. Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Stengl and Homberg, 1994; Helfrich-Förster, 1997; Reischig and Stengl, 2003a).

Eine weitere Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass die Maxima und andere hohe Werte in den analysierten Faserbereichen zu nicht übereinstimmenden Zeitpunkten erscheinen (jeweils Faser-Diagramme in Abb. 3.1, S. 66; Abb. 3.3, S. 72; Abb. 3.6, S. 77). Solche Unterschiede sind in anderen Insekten bisher nicht beobachtet worden (persönliche Mitteilung Helfrich-Förster), könnten aber mit voneinander abweichenden Transportgeschwindigkeiten in die diversen Gehirnareale oder zeitlich differenten Freisetzungen des Neurotransmitters erklärt werden und als Indiz für verschiedene Output-Rhythmen gelten (Aktivitätsrhythmus, Rhythmen in der olfaktorischen oder visuellen Sensibilitäts-einstellung). Fakt ist, dass die PDF-Neuriten im Gehirn der Honigbiene in beinahe alle Gehirnbereiche projizieren, die mit verschiedensten Sinneswahrnehmungen oder der Lokomotoraktivität in Verbindung gebracht werden können. So ist PDF in den optischen Loben, Ozellen, Antennalloben und fast im gesamten Protocerebrum präsent (siehe Rekonstruktionen in Abb. 3.12, S. 89 oder Abb. 3.13, S. 90). Zusammenhänge zwischen PDF-Oszillationen und einzelnen Output-Rhythmen müssten in zukünftigen Studien erforscht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in den Neuriten zwar unterschiedliche Konzentrationen vorherrschen, aber keine rhythmischen Oszillationen, was durch die fehlende Signifikanz ausgedrückt wird.

Bei zahlreichen Insekten war es möglich, die PDF-Zellen nach verschiedenen Größenklassen, räumlich getrennten Clustern und/oder nach für sie spezifischen PDF-Oszillationen zu charakterisieren (z. B. Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Park et al., 2000; Stengl and Homberg, 1994; Abdelsalam et al., 2008; Vafopoulou et al., 2010). Auch bei der Honigbiene wurde versucht, ungeachtet des geballten Gefüges und des offensichtlich weitreichenden Größenspektrums der PDF-Somata, nach Größenklassen differenzierte PDF-Oszillationen aufzudecken. Trotz vieler Aufteilungsversuche konnte ANOVA unter LD keine signifikanten Konzentrationsveränderungen in Abhängigkeit der Zeit herausfinden. Auch die Berechnung des PDF-Färbeindex (siehe unten) führte zu keinen signifikanten Ergebnissen. Damit bestätigt sich die Annahme, dass unter LD in den PDF-Zellkörpern keine signifikanten Oszillationen, höchstens Tendenzen zu solchen, existieren. Betrachtet man die letztendlich vier durchgeführten Aufteilungen (Abb. 3.4, S. 74 und Abb. 3.5, S. 75), fällt auf, dass der PDF-Färbeintensitäts-Peak, wenn auch nicht signifikant, dann zumindest tendenziell von kleineren Zellen verursacht wird. Unter Berücksichtigung einer stets vorhandenen Gesamtanzahl an PDF-Neuronen, die aufgrund fehlender PDF-Expression zu bestimmten Zeitpunkten nicht detektiert wird (Bestimmung des Färbeindex), verstärkt sich der Trend der kleinen Zellen, den Peak zu bewirken. Auch scheinen



sie die grafische Mulde zwischen ZT22 und ZT2 hervorzurufen. Diese Neigung ist besonders ausgeprägt, wenn die Trennung bei 280  $\mu\text{m}^2$  Querschnittsfläche durchgeführt wird. Interessanterweise ähnelt der Verlauf der großen Zellen eher den PDF-Oszillationen, die in den Zellkörpern unter DD entdeckt wurden (dazu mehr in Kapitel 4.1.4). Eine konstante Zahl von Zellen einer bestimmten Größe oder ein spezielles Verhältnis von größeren zu kleineren Zellen konnte nie beobachtet werden.

#### 4.1.4 Sammelbienen unter DD (4. Exp.)

Das vierte Experiment sollte eruieren, ob die bei Sammelbienen unter LD gefundenen signifikanten PDF-Oszillationen in den Fasern der Medulla sowie zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula unter DD ohne äußere Zeitgeber fortdauern und somit endogen gesteuert werden. Tatsächlich stellte sich abermals die PDF-Oszillation in der Medulla als signifikant heraus (Diagramm „Fibers“ in Abb. 3.6, S. 77,  $p = 0,010$ ). Dies ist ein Indiz dafür, dass der PDF-Zyklus von einer endogenen Uhr kontrolliert wird und nicht eine reine Antwort auf äußere Zeitgeber, wie den LD-Wechsel, darstellt.

Überraschenderweise kristallisierte sich der vormals unter LD nicht signifikante zeitliche Verlauf der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Zellen unter DD als signifikant heraus (Abb. 4.15, S. 154,  $p = 0,030$ ). Möglicherweise maskiert der Licht-Dunkel-Zyklus den endogenen PDF-Rhythmus. In der Tat scheint Licht an einen starken, hemmenden Effekt auf PDF auszuüben. Unter LD steigt die PDF-Konzentration in den Zytoplasmen während der Nacht von ZT14 bis ZT22 leicht, aber kontinuierlich an. Mit Licht an fällt die Kurve auf ihren niedrigsten Wert bei ZT2, um anschließend wieder bis zu ihrem höchsten bei ZT6 anzusteigen. Diesen Einschnitt zeigen alle Grafen, die in vorangegangenen, unter LD durchgeführten Experimenten ermittelt wurden. Unter konstanter Dunkelheit fehlt ein solches Masking. Vergleicht man den PDF-Zyklus unter LD und DD, fällt auf, dass die Kurven um etwa 12 Stunden versetzt verlaufen. Da der endogene Lokomotor-Aktivitätsrhythmus bei Sammelbienen um die 23,0 Stunden beträgt (Moore and Rankin, 1985), kommt eine derart große Verschiebung nach bereits drei Tagen im Inkubator nicht infrage. Das spricht eher dafür, dass der endogene PDF-Rhythmus durch den LD-Zyklus maskiert sein könnte. Pyza and Meinertzhagen (1997a) diskutierten bei *Musca domestica* die Möglichkeit, dass der endogene Rhythmus in der Größe der PDF-Varikositäten durch ein Masking, hervorgerufen durch die Lichtexposition, beeinflusst wird. Bei der Hausfliege kommen unter DD während des subjektiven Tages signifikant größere Varikositäten in der Lamina und Medulla vor als während der subjektiven Nacht. Unter LD registrierten die Forscher dagegen in der Mitte der Nacht größere Varikositäten.

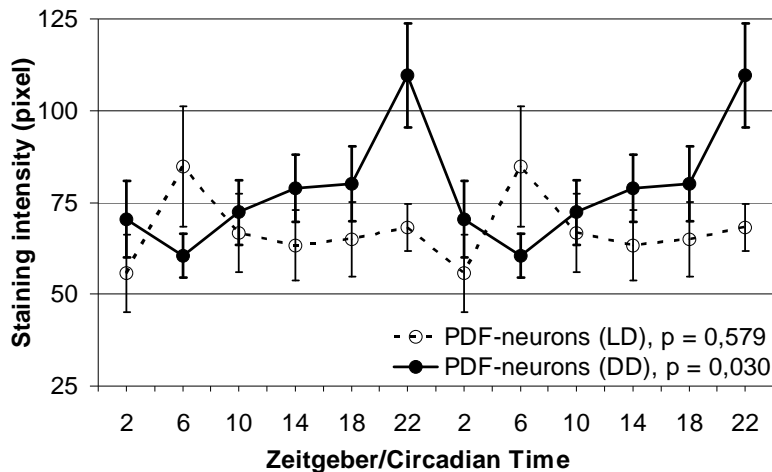


Abb. 4.15: Die PDF-Färbeintensität bei Sammelbienen unter LD 12:12 und DD. Fehlerbalken = SE („standard error of mean“).

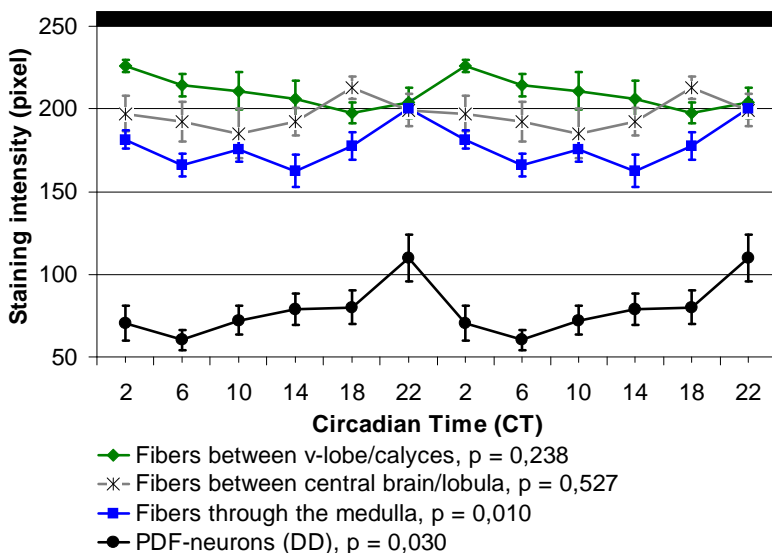


Abb. 4.16: Die PDF-Färbeintensitäten der untersuchten Faserbereiche und der Zytoplasmen der PDF-Neurone in Gehirnen von Sammelbienen unter DD. Fehlerbalken = SE („standard error of mean“).

Im Gehirn der adulten Grille *Gryllus bimaculatus* ermittelten Abdelsalam et al. (2008) beim Peak unter DD eine doppelt so hohe maximale PDF-Konzentration als beim Peak unter LD (siehe 4.1.1, S. 135).

Auch wenn bei den Färbeintensitätsanalysen bei der Honigbiene keine absoluten Konzentrationen bestimmt werden können, so kann zumindest ein Intensitätsvergleich unternommen werden. Dabei fällt der Peak bei Sammelbienen unter DD ebenfalls deutlich höher aus als unter LD. Im Unterschied zur Grille, bei der die Höchstwerte unter LD und DD zum identischen Zeitpunkt vorkommen, sind bei den Sammelbienen die

Peaks unter den verschiedenen Licht-Behandlungen etwa 12 Stunden „out of phase“ (siehe oben).

Dass der endogene Rhythmus von den PDF-Zellen in die Medulla übertragen werden könnte, verdeutlicht nicht nur die Signifikanz, sondern auch der sowohl in den Zytoplasmen als auch in den Fasern der Medulla gleichzeitig auftretende Peak bei CT22 unter DD (Abb. 4.16). Das zeitliche Auftreten der PDF-Färbeintensitäts-Höchstwerte in den verschiedenen Faserbereichen variiert ansonsten und könnte, wie bereits im vorigen Versuch angedeutet (siehe S. 152), mit der Einstellung verschiedener Sensitivitätsrhythmen zusammenhängen. Diese Hypothese wird durch anatomisch morphologische Resultate über die 3-D-Rekonstruktion gestützt (siehe 4.3.3 ab S. 165).

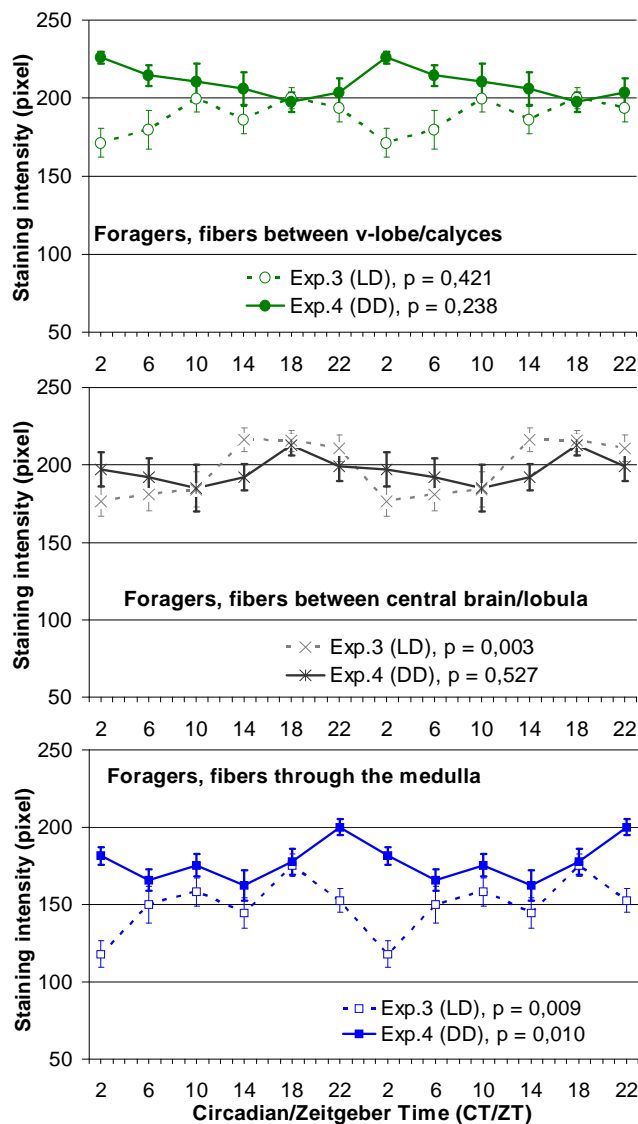


Abb. 4.17: Die PDF-Färbeintensitäten in den untersuchten Faserbereichen im Sammelbienenhirn unter LD 12:12 und DD. Die jeweiligen Peaks kommen zeitlich versetzt vor. Erklärung siehe Text.

In einer Gegenüberstellung LD zu DD treten die Peaks der zeitlichen Fortgänge der PDF-Färbeintensitäten in den verschiedenen Faserbereichen überwiegend versetzt auf (Abb. 4.17): im Fall der signifikanten Oszillationen in den Fasern, die durch die Medulla ziehen, unter LD bei ZT18 und unter DD bei CT22; zwischen dem Zentralgehirn und der Lobula unter LD (signifikant) bei ZT14 und unter DD (nicht signifikant) bei CT18 und im Fall der nicht signifikanten Oszillationen zwischen den Calyces und dem v-Lobus unter LD bei ZT18 und unter DD bei CT2. Dieses Resultat würde eher dafür sprechen, dass die endogene Uhr, wenn PDF als Output-Faktor bezeichnet wird, mit einer Periode länger als 24 Stunden oszilliert. Tatsächlich beträgt der freilaufende Lokomotor-Aktivitätsrhythmus der Biene weniger als 24 Stunden, laut Moore and Rankin (1985) 23,0 Stunden.

Der endogene Rhythmus der PDF-Färbeintensitäten in den Zytoplasmen

ist durch das Ansteigen der PDF-Konzentration, beginnend am frühen Abend, durch die ganze Dunkelphase geprägt und gipfelt zum Ende der Nacht in seinem Höchstwert. Um den Wechsel subjektive Nacht zu subjektivem Tag sinkt die PDF-Konzentration, der Tiefstwert wird letztendlich zu CT6 erreicht. Dieser Verlauf erinnert an die *cry*- und *per*-mRNA-Oszillationen im Gehirn der Honigbiene (Abb. 1.3, S. 13; Rubin et al., 2006; Bloch et al., 2010), wobei sich der PDF-Peak unter DD in die späte Nacht verschoben darbietet. Die Koinzidenz könnte für PDF ebenfalls als Output-Faktor der endogenen Uhr sprechen.

Die zeitabhängige Entwicklung der PDF-Zellanzahl ist unter DD nicht signifikant. Berücksichtigt man den Trend des unter DD registrierten Verlaufs, entsprechen die Höhen und Tiefen der Kurve denen unter LD (Abb. 4.18, S. 156). Der LD-Graf startet zu Tagesbeginn

mit seiner niedrigsten Zellanzahl, vielleicht initiiert durch die hemmende Wirkung des Lichts, beim DD-Graf dagegen befindet sich das Minimum in der späten Nacht und die Zellzahl steigt zu „Tagesbeginn“ bereits deutlich an.

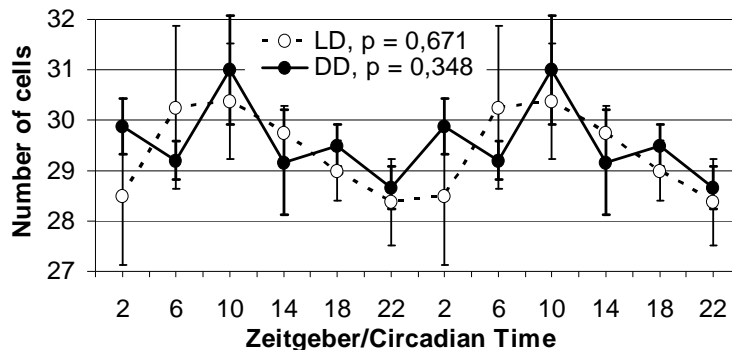


Abb. 4.18: Die Anzahl an PDF-Neuronen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD 12:12 und unter DD.

In der Diskussion zum ersten Experiment wurde die Vermutung aufgestellt, nach der wie bei der Schabe die Anzahl bestimmter PDF-Zellen durch Licht beeinflusst wird (Wei and Stengl, 2011; siehe 4.1.1, S. 129). Die zeitliche Entwicklung der PDF-Zellanzahl in

den Gehirnen der Sammelbienen zeigt im Vergleich LD zu DD kaum Unterschiede. In allen unter LD erfassten Grafiken sieht es nach einer Hemmung zu Tagesbeginn durch Licht aus. Sammelbienen verändern ihr diurnales Verhalten nicht, wenn sie unter DD gehalten werden (Shemesh et al., 2007), der Verlauf der PDF-Zellanzahl auch nicht, wohl aber die Oszillationsmuster. Stockbienen, die sich arrhythmisch verhalten, haben durchwegs weniger PDF-Zellen mit einer ausgeprägt niedrigeren Anzahl bei ZT4 (siehe erstes Experiment). Sie ändern gemäß Shemesh et al. (2007) aber ihr Verhalten nicht, wenn sie zusammen mit der Brut einem Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt werden. Licht scheint weniger als auslösender Faktor für die Zellanzahl und Aktivitätsänderung infrage zu kommen. Die PDF-Verhältnisse in Stockbienen ohne Brutkontakt sind unbekannt und müssten in Zusammenhang mit diesem Parameter, wie von Shemesh et al. (2010) und in der Diskussion mehrfach angedeutet, in weiteren Studien untersucht werden.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln ausgeführt, können die PDF-Neurone bei zahlreichen Insekten in zwei oder drei Größenklassen (z. B. Nässel et al., 1991; Helfrich-Förster 1997; Abdelsalam et al., 2008; Review: Meelkop et al., 2011) mit oft eigenen PDF-Oszillationsmustern (z. B. Park et al., 2000; Abdelsalam et al., 2008; Vafopoulou et al., 2010; Review: Meelkop et al., 2011) unterteilt werden. Bei der Sammelbiene wird der Peak der PDF-Färbeintensität unter DD bei CT22 signifikant von größeren PDF-Zellen verursacht, wobei die kleineren bei der Ausprägung des Intensitätswertes, wenn auch nicht signifikant, so doch tendenziell beteiligt sind (Abb. 3.7, S. 79 und Abb. 3.8, S. 80). Die Zellanzahl ist bei beiden Größengruppen zum Zeitpunkt des Peaks nicht eklatant erhöht. Unter LD erscheint der Färbeintensitäts-Peak dagegen während des Tages bei ZT6 und wird vorrangig (nicht signifikant) von kleineren Zellen gebildet (Abb. 3.4, S. 74 und Abb. 3.5, S. 75). Die größeren Zellen treten zwar in Bezug auf die Entwicklung ihrer

Anzahl verstärkt bei ZT22 auf, wenn auch sich ihre Zahl nicht von der unter DD bei CT22 unterscheidet, prägen aber unter LD keinen Peak aus (gleiche Abb). Die Maximalwerte unter LD und DD werden also wahrscheinlich von unterschiedlichen Zellen verursacht. Die zellgrößenspezifischen Färbeintensitätsmaxima kommen besonders zum Ausdruck, wenn die Trennung der Zellgröße bei  $280 \mu\text{m}^2$  festgelegt wird. Ab dieser Querschnittsfläche und größer verändert sich der p-Wert bei der Färbeintensität für die großen Zellen unter DD nicht mehr ( $p = 0,004$  für Zellen  $> 280$  und  $> 300 \mu\text{m}^2$ ). Bildlich verglichen prägen den deutlichsten Peak unter LD die Zellen  $< 280 \mu\text{m}^2$  aus.

Meelkop et al. (2011) listen in ihrem Review ausführlich die Funktionen auf, die PDF zugespochen werden, wie z. B. die Verteilung der Schirmpigmente in den Komplexaugen und der Pigmente im Integument der Crustaceen (Rao and Riehm, 1988; Rao, 1992), die Aufrechterhaltung der circadianen Lokomotor-Aktivitätsrhythmik bei *Drosophila melanogaster* und *Leucophaea maderae* (Helfrich-Förster and Homberg, 1993; Petri and Stengl, 1997; Renn et al., 1999), die Synchronisation der Schrittmacherveurone untereinander (Renn et al., 1999), die Plastizität circadianer Rhythmen bei den Hummeln (Weiss et al., 2009) u.v.a. Die quantitativen Experimente deuten auch bei der Honigbiene auf eine mögliche Teilung der PDF-Zellen in vielleicht große und kleine hin. Der endogene Rhythmus scheint in die optischen Loben übertragen zu werden und könnte den größeren Zellen zugespochen werden. Die signifikanten Rhythmen in den Fasern unter LD (Medulla und „Loop“) unterscheiden sich grafisch deutlich von den nicht signifikanten, eher tendenziell vorhandenen Konzentrationsunterschieden in den Zytoplasmen. In den Fasern kommen die höchsten Färbeintensitätswerte in der Nacht und in den Somata tagsüber bei ZT6 vor. Die kleineren Zellen scheinen für die Maskierung unter LD-Wechsel verantwortlich zu sein und die größeren vor allem unter DD einen endogenen Rhythmus aufrechtzuerhalten. Unter Berücksichtigung einer ständig existenten, aber nicht stetig detektierbaren Gesamtanzahl, repräsentiert durch den Färbeindex, verschwindet die Signifikanz. Das spricht eher dafür, dass es sich innerhalb einer Zellgruppe um eine unveränderte Anzahl an Zellen mit unterschiedlich stark ausgeprägten PDF-Expressionen handelt.

Die vorhandenen Unstimmigkeiten zwischen den Experimenten in den Verläufen der PDF-Färbeintensitäten machen eine zielstrebige Diskussion schwer. Individuelle Abweichungen spiegeln sich zudem in den Fehlerbalken und damit in den einzelnen Individuen wider. Ursächlich verantwortlich dafür könnte die genetische Variabilität der einzelnen Tiere eines Stockes zueinander sein, da die Königin sich mit mehreren Drohnen paart und folglich ihre Eier mit Samen unterschiedlicher Väter befruchtet. Tautz (2007) beschreibt in seinem Buch „Phänomen Honigbiene“, dass der Superorganismus „Honigbienenstaat“ über die genetische Variabilität zur Feinjustierung aller Parameter befähigt

wird. Am Beispiel der Temperaturregulierung im Brutbereich des Stocks demonstriert er ein solches Regelwerk. Bei einem geringen Temperaturabfall im Brutnest beginnen die empfindlichsten Individuen mit dem Heizen. Je weiter der Istwert vom Sollwert abweicht, desto mehr reizunempfindlichere Tiere schließen sich dem Verhalten an. So kann „die Kolonie als Ganzes auf eine abgestufte Weise immer optimal auf Störungen“ reagieren, „da genau so viele Kräfte mobilisiert werden, wie es der Stärke der Störung angemessen ist“ (Tautz, 2007). „Ein breites Spektrum von hochempfindlichen bis sehr unempfindlichen Bienen führt automatisch immer zur richtigen Reaktionsstärke der Kolonie.“ So besitzt jede Biene einen eigenen Schwellenwert für das Beginnen mit dem Sammeln und einen eigenen endogenen Aktivitätsrhythmus. Diese genetische Variabilität dämpft oder überdeckt Oszillationen, erhöht die Fehlerbalken und erschwert eine Interpretation. Zudem handelte es sich in den Experimenten teils um unterschiedliche Kolonien. Die Bienen für die ersten beiden Versuche stammten aus Israel, die für die weiteren aus Regensburg. Unglücklicherweise musste nach dem dritten Experiment auf eine weitere Kolonie ausgewichen werden, da der vormals beprobte Bienenstock den Winter nicht überlebte.

Ein technisches Problem bestand mit dem konfokalen LSM. Es wurden grundsätzlich die identischen Einstellungen am Mikroskop für alle Präparate gewählt. Später, bei den ersten Versuchen Ganzhirne durchzuscannen, verschwand mit zunehmender Scandauer und Präparatedicke das Signal, ein Problem, das zeitabhängig zu sein schien und vermutlich durch Überhitzung entstand. Ob die technischen Schwierigkeiten mit feineren Nuancen bereits früher bestanden, ist unbekannt. Pro Sitzung am LSM wurde bei der quantitativen Untersuchung zwar ein kompletter Satz Gehirne (je eine Probe von jedem Zeitpunkt) gescannt, um Auswirkungen z. B. eines eventuell kontinuierlich schwächer werdenden Signals auf einzelne Zeitpunkte zu verhindern. Sehr wohl wirkt sich eine solche Signal-minderung auf den „allgemeinen“ Fehlerbalken aus.

## 4.2 Keine Kolokalisation von PER- und PDF-Neuronen

Bei *Drosophila melanogaster* sind PDF und PER in mehreren LN<sub>v</sub>s kolokalisiert, weswegen PDF als Output-Faktor der circadianen Schrittmacherneurone in andere Gehirnbereiche gilt (Helfrich-Förster, 1995). Bei der Honigbiene *Apis mellifera* konnten keine eindeutigen PER-enthaltenden PDF-Neurone identifiziert werden. Die parallel durchgeführte PER-Einfachfärbung und PER/PDF-Doppelfärbung lassen auf eine unbekannte Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers, der PER-Neurone detektieren sollte, schließen. Außerdem beschränken sich die Färbungen auf das Zytoplasma der Zellen und befinden sich nicht im Kern. Die von Bloch et al. (2003) und Závodská et al. (2003) charakterisier-



ten PER-Neurone konnten mit diesem Antikörper nicht bestätigt werden. Beide benutzten „Bouin Hollande Fixativ“. Vielleicht liegt trotz der positiven PDF-Färbung das negative PER-Ergebnis in dem Fixiermittel zugrunde.

### 4.3 Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene

Wie in der Einleitung erläutert (1.5.3, ab S. 20), sprechen zahlreiche Studien PDF diverse Rollen, unter anderem in der Inneren Uhr der Insekten, zu. Die Rekonstruktion des PDF-Projektionsmusters im Gehirn der Honigbiene oder ganz allgemein eines Insekts kann als Bezugssystem zum Verständnis der neuroanatomischen und funktionellen Organisation des im Gehirn befindlichen circadianen Systems oder anderer Funktionalitäten dienen.

#### 4.3.1 Die PDF-Somata und eine mögliche akzessorische Medulla

Bei Holometabolen liegen die PDF-Somata in jeder Hemisphäre zwischen dem optischen Lobus und dem Protocerebrum nahe und anterior der Medulla (Závodská et al., 2003; Bloch et al., 2003; Meelkop et al., 2011). Die dreidimensionale Visualisierung des PDF-Netzwerks im Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera* bestätigt die Lage der PDF-Zellkörper wie publiziert. Desgleichen verifiziert sich die Auffassung (Bloch et al., 2003), dass keine weiteren PDF-Neurone im Proto-, Deuto- und Tritocerebrum als auch in den optischen Loben der adulten Hymenoptere lokalisiert sind. Aussagen über das Suboesophagealganglion können aufgrund der Präparation nicht gemacht werden (siehe 2.4.1). In einigen intakten Ganzhirnen waren im Suboesophagealganglion keine gefärbten PDF-Zellen gesehen worden. Bei Hemimetabolen wie zum Beispiel dem Modellorganismus *Leucophaea maderae* (Reischig and Stengl, 2003b; Wei et al., 2010; Einleitung 1.5.2) oder der Grille *Gryllus bimaculatus* (Homberg et al., 1991b; Abdelsalam et al., 2008) dagegen existieren in den optischen Loben drei Stellen, auf die sich die PDF-Zellkörper aufteilen: der dorsale und ventrale Rand der Lamina sowie nahe der akzessorischen Medulla. Große Ähnlichkeiten bestehen zur taxonomisch nahe verwandten Hummel *Bombus terrestris*. Die ebenfalls sozial lebende Hymenoptere, die wie die Honigbiene eine Arbeitsteilung mit diurnal rhythmischen und rund um die Uhr aktiven Tieren vollführt, weist gleichfalls nur einen kompakten Zellhaufen an bis zu 15 PDF-Neuronen mit gleicher Lokalisation auf (Weiss et al., 2009). Dieser Ballen wird bei beiden *Apidae*-Vertretern von Zellen unterschiedlicher Größe gebildet, kann aber nicht in größenspezifische Cluster unterteilt werden, was typisch für soziale Hymenopteren sein könnte. Bei *Drosophila melanogaster* werden nahe der Medulla größenabhängig zwei PDF-Zellcluster unterschieden, die s-LN<sub>v</sub>s und die l-LN<sub>v</sub>s (Helfrich-Förster and Homberg, 1993). Auch andere Holometabole, wie zum Bei-

spiel die Dipteren *Musca domestica* und *Protophormia terraenovae* besitzen an gleicher Stelle zwei Gruppen an größenspezifisch unterscheidbaren Clustern, die teilweise den s- und l-LN<sub>v</sub>s gleichgesetzt werden (Meelkop et al., 2011; Nässel et al., 1991; Matsushima et al., 2004). Bei der hemimetabolen *L. maderae* weist man die bei der Medulla liegenden PDF-Zellen einem posterioren und einem anterioren Cluster zu (pPDFMe und aPDFMe, vgl. 1.5.2). Letzterer erlaubt die Aufteilung in drei Größenklassen (Reischig and Stengl, 2003b), wobei die großen aPDFMe-Neurone den l-LN<sub>v</sub>s der Taufliege und die mittleren deren s-LN<sub>v</sub>s gleichkommen sollen; den kleinen aPDFMe-Neuronen, die in den ipsilateralen optischen Lobus projizieren, konnten keine entsprechenden Gegenstücke zugeordnet werden. Im Gegensatz zu den erwähnten Insekten lässt sich der PDF-Cluster bei der Biene nicht größen- oder lagespezifisch klassifizieren. Auch Bloch et al. (2003) kamen diesbezüglich zu keinem anderen Ergebnis. In der Veröffentlichung variieren die Zellgrößen von 7-21 µm Breite und 10-29 µm Länge, was überschlagsmäßig umgerechnet 70 bis 609 µm<sup>2</sup> gleichkommt und im LD-Versuch (Experiment 3) meinen Messungen der Querschnittsfläche von minimal 62 bis maximal 620 µm<sup>2</sup> in etwa entspricht. Unter DD (Experiment 4) reicht die vermessene Fläche von minimal 90 bis maximal 708 µm<sup>2</sup>. Dennoch zeigte sich über alle Zeitpunkte hinweg eine fast gleichbleibende Durchschnittsgröße (keine Abbildung) sowohl unter LD (um die 240 µm<sup>2</sup>) als auch unter DD (275 µm<sup>2</sup>).

Innerhalb eines Clusters können bei der Honigbiene alle Größen, aber auch vorrangig kleinere oder nur größere Zellen vorkommen. Allerdings konnte bei den Experimenten zur PDF-Oszillation festgestellt werden, dass unter LD 12:12 tendenziell kleinere Zellen den Peak bei ZT6 und unter DD die größeren Zellen signifikant den Peak bei CT22 verursachen, wobei hier die kleineren tendenziell mitbestimmen (Abb. 3.4 bis Abb. 3.5 ab S. 74 und Abb. 3.7 bis Abb. 3.8 ab S. 79). Die visuelle Betrachtung lieferte abermals keine Präferenzen etwaiger Gruppen. So kommen zu allen Zeitgeber- und „circadianen“-Zeiten (ZT, CT) mehr oder weniger alle Variationen an Zelluntergliederungen vor (kleine Auswahl in Abb. 4.2, S. 131). Bemerkenswerterweise existieren in einigen Fällen sehr wohl Clusterbildungen, besonders die Bilder D und E bestärken mit den tendenziell verschiedenen Projektionsrichtungen den Verdacht, dass lagespezifisch unterschiedliche Zellen in verschiedene Gehirnareale ihre Fortsätze entsenden und vielleicht ähnlich wie bei der Taufliege unterschiedliche Aufgaben und Funktionen erfüllen könnten. Die bei der Honigbiene in den Fasern der Medulla entdeckten PDF-Oszillationen stehen jedoch im Widerspruch zu den Oszillationsverhältnissen bei der Taufliege, bei der eine circadian rhythmische Freisetzung des Neuropeptids in den Terminalen im dorsalen Gehirn festgestellt wurde (Park et al., 2000). Bloch et al. (2003) äußerten die Vermutung, dass der PDF-Zellcluster im Gehirn der Honigbiene die Homologe beider Zellklassen, s- und l-LN<sub>v</sub>s, enthält, da

„beide“ Projektionen – in den optischen Lobus und ins Protocerebrum – von dem einen Zellcluster ausgehen. Leider erlauben die immense Vielzahl an eng aneinander verlaufenden Fasern und die Färbungen fast ausschließlich in Varikositäten keine detailliertere Rekonstruktion und die Interpretationen bleiben hypothetisch.

Eine bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen Hummel und Honigbiene scheint PDF eine Rolle in der circadianen Organisation des Verhaltens zuzusprechen. Weiss et al. (2009) entdeckten signifikant mehr PDF-Neurone in sammelnden, diurnal rhythmischen Hummeln als in Nestaufgaben erfüllenden, rund um die Uhr aktiven. Auch bei der Honigbiene konnten weniger PDF-Neurone in ständig aktiven Stockbienen als in diurnal rhythmischen Sammelbienen registriert werden. Weiss et al. (2009) vermuten, dass die auffallende Ähnlichkeit der PDF-immunreaktiven Färbemuster in den Gehirnen der beiden Apiden grundsätzlich bei Hymenopteren besteht und begründen ihre Vermutung mit der nahen taxonomischen Verwandtschaft und der sich gleichenden Verhaltensökologie. Ein Unterschied besteht allerdings darin, dass die Arbeitsteilung bei den Honigbienen primär vom Alter und vermutlich vom Kontakt zur Brut abhängt (Shemesh et al., 2007; 2010) und bei den Hummeln von der Körpergröße.

Von den PDF-Somata ziehen bei der Honigbiene zahlreiche Neuriten nach median und verzweigen sich intensiv ins anteriore Protocerebrum und in den „Loop“, der gebündelt am Rand der Lobula entlangläuft und sich weiter posterior in den „hinteren“ Bereich des Protocerebrums und in die POC spaltet bzw. umgekehrt aus diesen auch herführen kann (Abb. 3.25, S. 95). Besonders viele Fasern erscheinen an der äußersten lateralen Ecke des Protocerebrallappens, wo sie sich an der Übergangsstelle zwischen dem optischen Lobus und dem Protocerebrum konzentrieren. Weiss et al. (2009) bezeichnen in der Hummel den PDF-ir intensiven Bereich am Rand des Protocerebrallappens neben den PDF-Somata als akzessorische Medulla. Die akzessorische Medulla gilt als ein im adulten Insekt vorkommendes Anhängsel der Medulla, das als Rest des larvalen optischen Neuropils definiert wird (Ehnbohm, 1948; Hagberg, 1986). Die meisten Holometabolen besitzen im Larvenstadium Stemmata, deren photorezeptorischen Axone in dem optischen Neuropil terminieren; nicht jedoch die zu den aculeaten Hymenopteren zählende Honigbiene (Gilbert, 1994). Entwicklungsbiologisch betrachtet benötigen die apoden Honigbienenlarven, die in ihren Wabenzellen im Futtersaft schwimmen, auch keine Stemmata, demnach dürften sie definitionsgemäß keine akzessorische Medulla aufweisen. Doch auch Insekten, deren larvale Stemmata über die Metamorphose hinaus degenerieren (*Manduca sexta*) oder die keine besitzen (i. Allg. Hemimetabole), können eine solche haben (Hornberg et al., 1991b). Schulz et al. (1984) vermuteten bereits, dass dieses Überbleibsel eine Rolle beim Entrainment der circadianen Uhr spielen könnte. Hagberg (1986) und Fleiss-

ner et al. (1993) erwägten, dass die Synchronisation der circadianen Uhr bei Holometabolen über die extraretinalen Photorezeptoren stattfindet. Bei der Taufliege wird sowohl das larvale optische Neuropil als auch beim adulten Tier die akzessorische Medulla intensiv von PDF-Neuriten innerviert und in der Tat zeichnen sich alle bisher beschriebenen akzessorischen Medullen durch eine dichte PDF-Innervierung aus (Helfrich-Förster, 1997). Das trifft auch bei Hemimetabolen wie der Schabe zu (Homberg et al., 1991b; Stengl and Homberg, 1994; Reischig and Stengl, 1996). Läsions- und Injektionsversuche haben gezeigt, dass PDF für eine normale Expression des Lokomotor-Aktivitätsrhythmus erforderlich ist (Petri and Stengl, 1997; Reischig and Stengl, 2003a). Auch bei der Biene scheinen PDF-Injektionen zu einer Veränderung im entsprechenden Verhalten zu führen (Kahana and Bloch, unpublished, in: Weiss et al., 2009). Bloch et al. (2003) folgten, wie sie schreiben, der Strategie nach Homberg et al. (1991b) und bezeichneten die intensiv PDF-gefärbte Region zwischen den PDF-Somata und dem Protocerebrum wie später auch bei der Hummel (Weiss et al., 2009) trotz fehlender Stemmata als akzessorische Medulla. Zudem rechtfertigten sie ihre Entscheidung mit dem Zitat: „The correspondence between the PDH-ir cell group in the honeybee and the AMe (accessory medulla) of other insects is so strong that we believe that these PDH-ir cells should be considered medullary neurons and that the neuropil densely innervated by their proximal processes should be designated as the honeybee AMe“, (Bloch et al., 2003). Die akzessorische Medulla bei der Schabe *Leucophaea maderae* ist deutlich in, kurz formuliert, Kern und Schale mit zugehörigen In- und Outputfunktionen strukturiert (siehe Einleitung 1.3), enthält zahlreiche Neuropeptide, die überwiegend kolokalisiert sind und zählt als Schrittmacherzentrum der Inneren Uhr (Stengl and Homberg, 1994; Reischig and Stengl, 1996; 2003b; Homberg et al., 2003; Petri et al., 1995). Dagegen wird sie bei *D. melanogaster* nur durch anti-PDF-Seren markiert, zeigt aber gleichfalls einen, wenn auch weniger deutlichen Aufbau; man unterscheidet ein Zentrum und eine ventrale Verlängerungszone (Helfrich-Förster et al., 2007a). Die dreidimensionale Rekonstruktion gibt im Gehirn der Honigbiene zwischen dem optischen Lobus und dem Protocerebrum zumindest einen umfangreichen Kreuzungsbereich im PDF-Netzwerk zu erkennen, der Projektionen in beinahe alle Gehirnregionen demonstriert und wahrscheinlich auch einen Informationsabgleich von ipsi- und kontralateral erlaubt (siehe 4.3.2). Von einer akzessorischen Medulla sollte indes erst geredet werden, wenn der Kreuzungsbereich tatsächlich als circadianes Schrittmacherzentrum charakterisiert werden kann. Der Nachweis einer Kolokalisation oder auch Lokalisation wichtiger Uhrneurone in unmittelbarer Nähe war in diesem Bereich bisher nicht erfolgreich.

Die PDF-Neurone bei der holometabolen *D. melanogaster* sind teilweise (s-LN<sub>v</sub>s) schon bei den Larven angelegt (Helfrich-Förster, 1997). Das larvale optische Neuropil empfängt den Licht-Input über Bolwig's Nerv, die akzessorische Medulla bei den adulten Fliegen wird über die Axone extraretinaler Photorezeptoren innerviert (Hofbauer and Buchner, 1989; Helfrich-Förster, 1997). Alle bisherigen Veröffentlichungen über die Honigbiene beziehen sich auf adulte Tiere. Die embryonale Entwicklung könnte bei der Frage nach dem Ursprung und der Innovierung der PDF-Neurone helfen. Spätere Untersuchungen zeigen, dass ganz allgemein auch bei der Honigbiene bereits in den Larven PDF-Neurone vorkommen (mündliche Mitteilung Helfrich-Förster und Kay).

#### 4.3.2 Projektionen im Protocerebrum zusammen mit Kommissuren

Das PDF-Netzwerk ist bei der Honigbiene beinahe im gesamten Protocerebrum verteilt. Da auch bei *Bombus terrestris* ein sehr ähnliches Projektionsmuster existiert (Weiss et al., 2009), liegt der Verdacht nahe, dass ein solches typisch für soziale Hymenopteren ist. Tatsächlich präsentiert es sich bei *Apis mellifera* erheblich komplizierter als bei *Drosophila melanogaster*, wo die PDF-Zellfortsätze ausschließlich ins dorsale Protocerebrum und in die Medulla (z. B. Helfrich-Förster et al., 2007a) reichen. Bei der Taufliege und der Schabe kontrollieren die PDF-Neurone als circadiane Schrittmacher den lokomotorischen Aktivitätsrhythmus (Helfrich-Förster, 1997; Helfrich-Förster et al., 2000; Stengl and Homberg, 1994; Petri and Stengl, 1997; Reischig and Stengl, 2003a). Die weit verzweigte Innervierung durch PDF-Fasern bei den beiden *Apidae*-Vertretern kann jedoch nicht prinzipiell mit der eusozialen Lebensweise korreliert werden, obwohl auch die zumindest soziale, aber hemimetabole Schabe *Leucophaea maderae* ein weitaus umfangreicheres PDF-Netzwerk (Wei et al., 2010), sogar im Protocerebrum – wenn auch nicht so ausladend und voluminös wie bei den beiden Hymenopteren – ausprägt. De facto gibt es zwischen verwandten Tieren oft, aber nicht grundsätzlich, eine ähnliche Ausprägung. So zeigten Vergleichsstudien über die PDF-Projektionsmuster in Gehirnen verschiedener *Drosophila*-Spezies, dass unter verwandten Arten deutliche Abweichungen, selbst mit vielseitigerer und weitreichenderer Verteilung im Protocerebrum sowie zusätzlicher PDF-Neurone, möglich sind (Hermann et al., 2013).

Das PDF-Netzwerk wird bei der Honigbiene von Varikositäten bestimmt. Daher kann von einer weitläufigen und innerhalb des Netzes flächendeckenden Verteilung des Neuropeptids ausgegangen werden. Gesamtheitlich betrachtet betreffen die Projektionen oftmals Areale, die zum Beispiel bei der visuellen und olfaktorischen Sinnesverarbeitung involviert sind, wie Vergleiche mit einigen Publikationen vermuten lassen. Im visuellen

System kommt es zu Überlappungen in der Medulla (siehe Kapitel 4.3.3) und im lateralen akzessorischen Lobus (LAL) des medianen Protocerebrums. Nach Mota et al. (2011) terminiert im LAL der aus dem anterioren optischen Tuberkel (AOTu) stammende TALT („*tubercle-accessory lobe tract*“, siehe Kapitel 3.3.4.4 ab S. 116). Die Wissenschaftler erwähnen, dass aus dem LAL Neurone Input in den Zentralkörper senden (Mota et al., 2011; Homberg, 1985; Milde, 1988). Im LAL der exemplarischen Biene existieren einige PDF-Neuriten, wobei eine tatsächliche Überschneidung nicht definitiv ist.

Die Hauptinnervation betrifft im ersten Gehirnabschnitt das ventrolaterale Protocerebrum (VLPr) mit dem ventrolateralen Plexus (VLP; Abb. 3.52, S. 110). Kirschner et al. (2006) beschreiben die Verzweigungen der Axone, die zu den, den Antennallobus verlassenden Projektionsneuronen gehören. Die Projektionsmuster sind im Kapitel 4.3.4 detailliert aufgezeigt und stimmen in ihrer beschriebenen Lage, inklusive der Gewebetiefe, überein.

Die zahlreichen Kommissuren lassen vermuten, dass PDF Informationen nach kontralateral entsendet und wahrscheinlich eine Rolle bei der Synchronisation beider Gehirnhälften innehat. Am deutlichsten zeigt das die posteriore optische Kommissur (POC), die beide Medullen verknüpft (Details 4.3.3). Für die Medulla bei der Honigbiene wurde eine ipsi- und kontralaterale Projektion der POC-Neurone beschrieben (Hertel, 1987a), für die Taufliege durch die I-LN<sub>s</sub> ebenfalls (Helfrich-Förster et al., 2007a). Vielleicht verbinden und synchronisieren die vielen Kommissuren mehr oder weniger alle gegenüberliegenden Neuropile. Das posterior der v-Loben entdeckte Triangel stellt vermutlich Bahnen dar, die die PDF-Fasern aus unterschiedlichen Projektionsgebieten nach kontralateral lenken. Besonders deutlich zeigt das der ventrale Trakt des Triangels, der aus dem VLP in Richtung Gehirnmitte zieht (Abb. 3.58, S. 112) und sich dort in beiden Strängen der ventralen „Doppelkommissur“ fortsetzt (Abb. 3.65, S. 122). So könnte es vielleicht zu Sensitivitätseinstellungen in Sinnessysteme verarbeitenden Arealen und gleichzeitig zu deren Synchronisation mit der entsprechenden kontralateralen Seite kommen.

Der Versuch, die Projektionen im Protocerebrum wie bei der Schabe in Plexen zu unterteilen (Wei et al., 2010; Kapitel 3.3.4.4 „PDF-Neuriten im Protocerebrum“ ab S. 109), veranschaulicht vor allem im „*anterior lateral fiber plexus*“ (ALFP; entspricht AFP der Schabe), „*ventrolateral plexus*“ (VLP) und „*inferior lateral protocerebrum*“ (ILPr) erstaunliche Ähnlichkeiten bezüglich der Verlaufsmuster. Zudem scheinen zahlreiche Verzweigungsbäume blind in diversen Arealen zu enden (z. B. Plexus 1 lateral, Plexus 3 dorsoposterior im Protocerebrum und posterior der Pilzkörper). Bei der Schabe konnten Wei et al. (2010) darlegen, dass Plexen aus der AOC und der POC miteinander verschaltet bzw. verbunden sind und es somit zu einem Informationsaustausch der beiden großen Kommissuren kommen könnte. Bei der Honigbiene konnten die Varikositäten nicht immer zu detaillierten

und definitiven Verläufen rekonstruiert werden. Auch sind die PDF-Kommissuren nicht in der gleichen Ebene wie die AOC, die in den mikroskopischen Aufnahmen identifiziert wurde, anzutreffen (keine Abbildung). Trotzdem lassen die Projektionsmuster vermuten, dass es zu Zusammenläufen oder Verschaltungen zwischen PDF-Verzweigungsbäumen kommt, was besonders deutlich zwischen dem ALFP und dem Plexus 2 und dem VLP zum Ausdruck kommt. Die PDF-Fasern führen aus den Zellen heraus, teilen sich in Kommissuren, aus denen die verschiedenen Plexen herausziehen. Der Input in den VLP könnte sowohl über die eben beschriebenen Bereiche und Strukturen ipsi- oder/und kontralateral erfolgen als auch von den ipsilateralen Somata über den Plexus 2 kommen.

Mobbs (1985) und Hertel (1987a) beschreiben eine „*anterior commissure*“ (a.c.), die sich von median aus nach anterior und posterior um die Pedunculi gabelt. Die PDF-Fasern scheinen nicht in der AOC zu verlaufen, sondern nach anterior versetzt (keine Abbildung). Bei der Schabe *Leucophaea maderae* beschreiben Wei et al. (2010) ein Faserbündel, das sich aus ipsi- und kontralateralen aPDFMe-Neuriten zusammensetzt und zwischen akzesorischer Medulla und der Gabelung dieses Traktes in die AOC und POC verläuft. Das als „*lobula valley tract*“ (LVT) bezeichnete Bündel zieht auf der posterioren Seite der Lobula entlang (Abb. 1.7, S. 17). Ein vergleichbares Faserbündel konnte im Gehirn der Honigbiene nicht entdeckt werden. Der „Loop“ stellt eher einen Teil der POC dar, der eine Gabelung ins posteriore Protocerebrum (Abb. 3.25, S. 95) und zwei Verbindungswege in die Medulla hat, die aus kontralateralen Fasern bestehen sollten (vorstellbar in Abb. 3.28f ab S. 97). Sollte die AOC doch PDF-Fasern führen (entspricht vielleicht dem türkisblauen Faserbündel in Abb. 3.54, S. 111), zweigt diese vermutlich gleich beim Eintritt in den Protocerebrallappen ab. Übrig als potentieller LVT bliebe lediglich das kurze Faserbündel zwischen PDF-Somata und dem lateralen Eintritt ins Protocerebrum.

### 4.3.3 Projektionen im visuellen System

Fast identisch präsentieren sich die PDF-Projektionsmuster in den optischen Loben von *Bombus terrestris* (Weiss et al., 2009) und *Apis mellifera* (Abb. 2.5, D, S. 46; Bloch et al., 2003), was auf ein für Hymenopteren charakteristisches PDF-Netzwerk schließen lässt. Die Lamina und die Medulla werden bei beiden *Apidae*-Vertretern über die ganze dorso-ventrale Länge von, betrachtet pro Schnittebene, wenigen varikosen, eher dünn und spärlich erscheinenden Fasern durchzogen (Beispiel für die Honigbiene gleiche Abb. wie oben und Abb. 4.19, S. 166, für die Hummel siehe Weiss et al., 2009).

In der Lamina konzentrieren sich die tangentialen Fasern auf die innerste proximale Schicht, die nach Ribi (1974) dem Stratum C entspricht (vgl. 3.3.2, S. 88). Durch diese



Schicht ziehen die „*long visual fibers*“ der Photorezeptorzellen R1, 5 und 9 auf ihrem Weg zur distalen Medulla, wo sie terminieren (Ribi, 1975; Yamaguchi and Heisenberg, 2011). R1 und R5 sind blau- oder UV-sensitiv, R9 konnte keine eindeutige spektrale Sensitivität zugewiesen werden (Wakakuwa et al., 2005), bei Ribi (1979) galt sie als UV- und für polarisiertes Licht sensitiv. Zudem sind in der erwähnten Schicht die monopolaren L1- bis L4-Axone enthalten, von denen die L1 und L4 Verzweigungen im Stratum C ausprägen (Ribi, 1976). Interessanterweise verlaufen die PDF-Fasern bei den meisten bisher untersuchten Insekten am inneren proximalen Rand der Lamina (vgl. Homberg et al., 1991b).

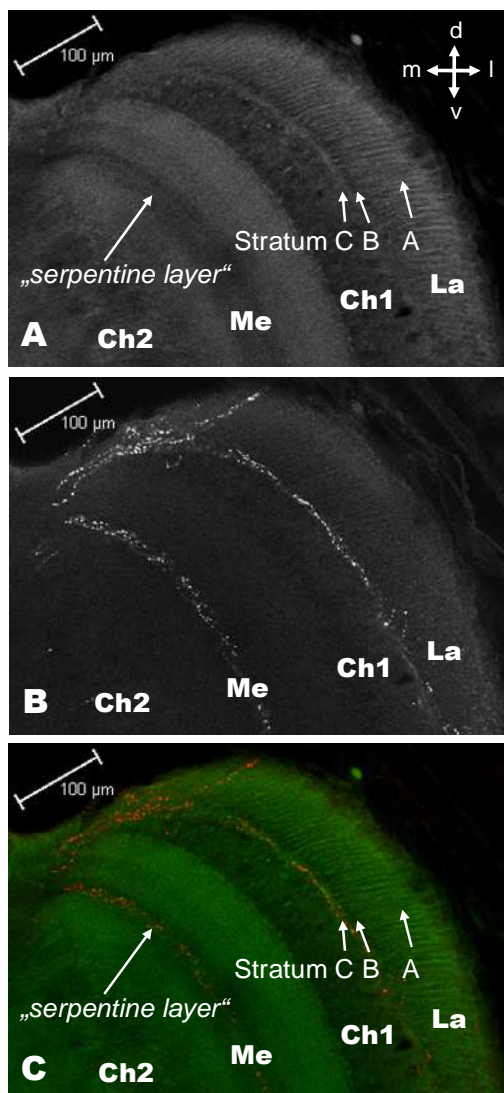


Abb. 4.19: Die Lamina- und Medulla-Stratifikation im optischen Lobus der Honigbiene (Frontalschnitt).

**A:** Neuropile; **B:** PDF-Färbung; **C:** beide Kanäle (A und B) überlagert. Die PDF-Färbung ist in C rot dargestellt.

Abk.: Ch = Chiasma, Me = Medulla, La = Lamina.

Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt, dass sich in der Medulla die Neuriten von den Zellkörpern kommend netzförmig über die ganze Serpentine Layer verteilen (trotz der eher spärlichen Erscheinung in Schnittpräparaten) und erinnert an die Projektionsverhältnisse bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Abbildungen in Helfrich-Förster et al., 2007a) und der Schabe *Leucophaea maderae* (Wei et al., 2010). Bei Ersterer senden die I-LN<sub>v</sub>s PDF-Neuriten über die ipsilaterale akzessorische Medulla in die Serpentine Layer beider Medullen. Bei Letzterer ziehen die aPDFMe-Neuriten ebenfalls über die akzessorische Medulla fächerartig in die am meisten distal liegende Medullaschicht. Senkrecht aus dem Fächer heraus verlängern sich bei der Schabe einige Fasern bis in die Lamina hinein. Diese Verlängerungen könnten bei der Honigbiene den rot dargestellten Fasern in Abb. 3.40 und Abb. 3.41 ab S. 102f entsprechen, die vermutlich aus dem Medullafächer median der Serpentine Layer austreten, die Medulla anterior umspannen und senkrecht abknickend in die Lamina eintreten. Diese Projektion wird bei der Schabe als erster Projektionsweg für die Medullainnervierung beschrieben. Bei der Biene nicht präsent oder nicht erkennbar zu sein scheint der bei der Schabe zweite, als „*median*

*layer fiber system*“ bezeichnete Weg (siehe Einleitung 1.5.2).

Ein Vergleich der PDF-Projektionen mit der neuralen Organisation und visuellen Verschaltung im anterioren optischen Tuberkel (AOTu) der Honigbiene zeigt nur wenige Überlappungen: Mota et al. (2011) beschreiben retrograd gefärbte Neurone, deren Zellkörper am distalen Rand der Medulla liegen und deren Neuriten durch die Medulla bis in die Serpentine Layer reichen, dort rechtwinklig abknickend in diese eintreten, ein Stück parallel mitlaufen und dann rechtwinklig in Richtung Lobula austreten. Die Axone bündeln sich zum AOT (anteriorer optischer Trakt) und ziehen in das AOTu hinein, das den visuellen Input aus der Medulla und Lobula verarbeitet. Enthalten sind dabei auch Neuriten, die aus der „*dorsal rim area*“ (DRA) stammen und laut den Forschern Informationen von den „*long visual fibers*“ der Photorezeptorzellen erhalten könnten (vgl. S. 168). Im optischen Lobus beschränkt sich der mögliche Einflussbereich des PDFs auf den Input zum AOTu, also auf die serpentine Schicht in der Medulla.

Die anatomisch-morphologischen Befunde und die Projektionsmuster, die oben aufgelistet wurden, sprechen dafür, dass PDF eine Rolle bei der Übertragung rhythmischer Signale in die optischen Loben spielen könnte. Auch die bei der Honigbiene sowohl unter LD als auch DD (Kapitel 3.1) signifikanten PDF-Oszillationen in den Medulla-Fasern (die Lamina-Fasern müssten daraufhin noch getestet werden) bestärken diese Hypothese. Nach Helfrich-Förster et al. (2007a) erinnern die Projektionsmuster im Gehirn der Taufliege, die wie oben beschrieben Gemeinsamkeiten mit der Honigbiene zeigen, an die Funktion des PDHs in Crustaceen, wo es über die retinale Schirmpigmentverteilung die Sensitivität der Augen an die diurnal unterschiedliche Helligkeit bzw. die Tag-Nacht-Wechsel anpasst. Die exorbitant vielen Varikositäten, die das Projektionsmuster bei der Honigbiene prägen, sprechen für eine flächendeckende Verteilung von PDF, das parakrin freigesetzt wird. Pyza and Meinertzhagen (1997a; 1999) stellten fest, dass sich die Größe der PDF-Varikositäten bei *Musca domestica* zyklisch verändert (während des subjektiven Tages sind im DD weniger große Varikositäten vorhanden). Zudem fanden die Forscher zyklisch unterschiedliche Axondurchmesser der Lamina-Monopolaren (Meinertzhagen and Pyza, 1996), eine Fluktuation in der Anzahl der Synapsen in Photorezeptorterminalen und in der Schirmpigmentverteilung. PDF könnte bei der Honigbiene aufgrund der anatomischen Projektionsgebiete die gleiche Funktion ausüben.

Im optischen Lobus fallen zahlreiche PDF-Fasern auf, die ganz dorsal in die Lamina projizieren (weiße Pfeile in Abb. 2.5, D, S. 46). Hier ziehen bei *B. terrestris* scheinbar alle, in der Rekonstruktion von *A. mellifera* der Hauptanteil der Fasern auf dem Weg in die optischen Neuropile entlang (Abb. 3.33, S. 98). In den Schnittpräparaten der Honigbiene konnte eine ventrale Innervierung zunächst wie bei der Hummel kaum ausgemacht

werden, diese Projektionen wurden erst über Ganzhirnfärbungen erkennbar, was auch für den posterioren Verlauf der Laminafasern am konkaven Innenrand des ersten optischen Neuropils gilt.

Zudem existiert eine in der Honigbienen-Lamina auffallende Übereinstimmung mit der Schabe (Wei et al., 2010), die für die Hummel nicht erwähnt wird (Weiss et al., 2009). In der dorsalen „Ecke“ der Lamina ragen die PDF-Terminalen nach dorsolateral in die distal äußere Spitze hinein. Den Ursprung der tangentialen Lamina- und Medullafasern sehen Wei et al. (2010) bei der Schabe in den aPDFMe-Somata und nicht in den dorsalen und ventralen PDFLa-Neuronen, die indes ins erste optische Chiasma projizieren und der Honigbiene wie auch anderen Holometabolen fehlen. Die in die dorsale „Ecke“ ragenden PDF-Terminalen stammen laut Wei et al. (2010) ebenfalls aus dem Medulla-Fächer. Das Komplexauge der Honigbiene weist am äußersten dorsalen Bereich für polarisiertes Licht sensitive Photorezeptoren auf (Abbildungen in Brockmann and Robinson, 2007). Die Region wird als „*dorsal rim area*“ (DRA) bezeichnet. In der dorsalen Lamina und Medulla setzen sich die Strukturen fort. Die starke PDF-Präsenz in den dorsalen Übergangsbereichen zwischen den Neuropilen könnte vielleicht mit einer Sensitivitätseinstellung für polarisiertes UV-Licht zusammenhängen. Ribi (1979) fand im am meisten dorsal liegenden Bereich der Lamina auffallend viele „*long visual fibers*“, die er den R9 zuordnete, und die glatt sowie ohne Verdrehungen durch die ganze Lamina hindurchziehen. Eine präzise Zuordnung der DRA innerhalb der Neuropile ist mit den vorliegenden Aufnahmen leider nicht möglich.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die PDF-Fasern bei der Honigbiene ausschließlich im ventralen Teil der drei Ozellen terminieren. Dieses Phänomen ist im MOc ausgeprägter als in den LOcs (Abb. 3.68, S. 124). Die äußere Eindellung der Honigbienenozelle führt zu einer Teilung in einen dorsalen und einen ventralen Bereich, die sich von der Linse über die Retina in die Neuropile fortsetzt (Ribi et al., 2011). Der dorsale Part ist auf den Horizont gerichtet, der ventrale himmelwärts. Die ventralen Retinulazellen sind deutlich kürzer als die dorsalen und enthalten über ihre ganze Länge dicht gepackt rote Schirmpigmente. Die Mikrovilli in den gepaarten ozellaren Retinulazellen sind senkrecht zum Rhabdom ausgerichtet, ein Hinweis auf eine mögliche Sensitivität für die Polarisierungsebenen des Himmelslichts. Velarde et al. (2005) entdeckten zudem zwei Opsine in den Ozellen der Honigbiene: kurzwelliges AmUVop und langwelliges AmLop2, wobei Ribi et al. (2011) darauf hinweisen, dass gemäß der Abbildung (Fig. 3h) in Velarde et al. (2005) das kurzwellige Opsin vor allem in der ventralen Retina exprimiert wird. Dieses Verteilungsmuster erinnert auffallend an das ventrale Vorkommen der PDF-Fasern im MOc (Abb. 3.68, S. 124) und weist abermals auf eine Sensitivitätseinstellung für polari-

siertes UV-Licht hin. Zudem projizieren die Retinulazellen in den ersten ocellaren Plexus, wo sie auf Interneurone in den ocellaren Trakten verschalten. Der mediane ocellare Trakt teilt sich um die zentrale Trachee, die durch die Pars intercerebralis führt, und zieht mit jedem Ast, begleitet von dem jeweiligen lateralen ocellaren Trakt durch dieselbe posterior und auch anterior der Protocerebralen Brücke nach ventral (Pan and Goodman, 1977). Unterhalb der Trachee können die einzelnen Trakte und Fasern kaum mehr differenziert werden, was sich auch auf die PDF-Fasern in dem Bereich bei der Rekonstruktion übertragen hat. Die Fasern der ocellaren Trakte bleiben teils auf der ipsilateralen Seite, teils kreuzen sie nach kontralateral. Nach Pan and Goodman (1977) terminieren sie unter (ventral) und anterolateral der Protocerebralen Brücke, zudem nahe des suboesophagealen Foramens und in thorakalen Ganglien. Interessanterweise erwähnen die Wissenschaftler zwei Fasern, deren Durchmesser in verschiedenen Präparaten variierten. Da die varikosen PDF-Neuriten im Bereich der ocellaren Trakte passend der Beschreibung verteilt sind, erinnert das wie schon im optischen Lobus an die PDF-abhängigen zyklischen Veränderung, wie u. a. in Axondurchmessern, die Pyza and Meinertzhagen (siehe oben) in ihren zahlreichen Publikationen beschrieben haben. Dieser Zusammenhang müsste ähnlich der Veröffentlichungen auch bei der Biene getestet werden. Die Zweiteilung der Ozellen und die Innervierung durch PDF nur des einen, ventralen Bereichs deuten auf verschiedene Funktionen der Ozellen hin, die nach Ribi et al. (2011) zum einen in der Registrierung der Fluglage und Haltung des Kopfes, zum anderen vielleicht in der Registrierung des Polarisationsmusters des Himmelslichts zur Kompassorientierung liegen.

Bei der Schabe ergaben Vergleichsstudien eine Beteiligung der Ozellen bei der lichtabhängigen Synchronisation der Inneren Uhr unter schwachen Lichtverhältnissen (Hofer, 2004). Außerdem fanden Loesel and Homberg (2001) eine Verbindung zwischen ocellarem Nerv und der akzessorischen Medulla. Bei der Biene sieht es so aus, als ob die ocellaren PDF-Fasern mit der POC verbunden sind (Abb. 3.70, S. 124). Eine Übertragung des PDF-Signals in die Ozellen ist damit denkbar.

Unterschiede in den optischen Loben zwischen Biene und Hummel bestehen im Vergleich mit der Publikation von Weiss et al. (2009) hauptsächlich in der etwas größeren Zahl an PDF-Neuriten, die posterior um die Lobula laufen und sich bei der Honigbiene auf die dorsale Hälfte des Neuropils und nicht wie bei der Hummel die ventrale beschränken. Dass die Fasern nicht in der Lobula, wie bei Bloch et al. (2003) geschildert, sondern posterior um die Lobula herum an deren Rand entlang verlaufen, lässt erst die 3-D-Visualisierung erkennen. Interessanterweise treten bei der Biene diese Neuriten auf der lateralen Seite der Lobula über die konkave Innenseite der Medulla etwa mittig in dieselbe ein. Ob die Fasern von ipsilateralen Zellen posterior um die Lobula oder umgekehrt aus der Medulla

heraus um die Lobula herumlaufen oder vielleicht über die POC von kontralateral herüberziehen, bleibt ungewiss. Der direkte Weg wäre der von kontralateral. Ganz allgemein liegt die Vermutung nahe, dass Projektionen von den Zellen aus in die ipsilateralen optischen Loben möglichst direkt nach lateral außen gerichtet sind, außer sie durchziehen oder streifen auf ihrem Weg wichtige Zentren, wie zum Beispiel eine akzessorische Medulla. Prinzipiell sollte der kürzeste Weg bevorzugt sein. Demhingegen berichten Abdelsalam et al. (2008) von haarnadelförmigen Faserverläufen in den optischen Loben der Grille *Gryllus bimaculatus*. Von den vier I-PDFMe-Neuronen kommend erstrecken sich einige PDF-Fortsätze zunächst in die ipsilaterale Medulla, folgen dort etwa 200 µm weit der am meisten distal liegenden Schicht in dorsaler Richtung und verlassen diese zur proximalen Medulla umkehrend, von wo aus sie sich durch den optischen Stiel in den Protocerebrallappen, explizit ins laterale Horn und ins superiore Protocerebrum, verlängern.

Bei *Drosophila melanogaster* werden die Medullen von PDF-Neuronen (I-LN<sub>v</sub>) beider Hemisphären innerviert, über den POT ziehen die PDF-Fasern in die kontralaterale Medulla (Helfrich-Förster et al., 2007a). Auch bei der Biene gibt es Hinweise, dass die PDF-Projektionen in der Medulla von ipsi- und kontralateralen PDF-Neuronen stammen könnten. Zunächst beschreiben Hertel et al. (1987a) die POC als eine Kommissur, die entgegengesetzte Projektionen beinhaltet. Die dazugehörenden Zellkörper sind gemäß der Publikation frontal der Lobula sowie median auf Höhe der dorsalen Hälfte der Medulla lokalisiert. Deren Neuriten verzweigen sich ipsilateral über die dorsale Hälfte und kontralateral über die gesamte Ausdehnung der Medulla, wobei sich die Innervierung auf die Serpentine Layer beschränkt. Diese Schilderung deckt sich mit der Rekonstruktion der PDF-enthaltenden POC. Auch hier liegen die Zellen frontal der Lobula (Abb. 3.20, S. 93). Ein Schwerpunkt an Fasern zieht von den Somata nach dorsolateral zur Medulla (Abb. 3.14, S. 91). Die Rekonstruktionen zeigen weitere Fasern zum einen dorsal sowie ventral der Lobula, die ebenfalls der Medulla zugeordnet wurden (Abb. 3.18, S. 93). Dorsal der Lobula passieren die Fasern unter dem „Loop“ hindurch (Doppelpfeile in Abb. 3.28, Abb. 3.29, S. 97) und führen aus der POC heraus. Ventral sind sie ebenfalls mit der POC bzw. auch mit dem „Loop“ verbunden und verzweigen sich weitflächig in die Medulla (gleiche Abbildungen, weiße Pfeile). Diese Projektionen könnten von kontralateral in die Medulla führen. Ein solches Projektionsmuster verstärkt die Hypothese, dass PDF eine Funktion bei der Synchronisation der beiden Hemisphären ausübt.

#### 4.3.4 Projektionen im olfaktorischen System

Olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs) in den sensorischen Epithelien der Antennen registrieren Geruchsmoleküle und leiten die Informationen über den Antennennerv, der sich aus sechs antennalen sensorischen Trakten (T1 bis 6) zusammensetzt, ins Gehirn der Honigbiene (beschrieben in Flanagan and Mercer, 1989; Galizia et al., 1999; Kirschner et al., 2006). Dabei gelangen T1 bis 4 in den Antennallobus (AL), wo sie jeweils separate Cluster an Glomeruli innervieren (Cluster T1–4). T5 und T6 ziehen am AL vorbei, terminieren im dorsalen Lobus (DL; T5), der als mechanosensorisches Zentrum des Deutocerebrums gilt, und im Suboesophagealganglion sowie im caudalen Protocerebrum (T6). Fünf antennoerebrale Trakte (ACTs), die aus Axonen von mit den Glomeruli verschalteten Projektionsneuronen (PN) bestehen, verlassen den Antennallobus und ziehen in höhere Zentren des Gehirns. Je nach Position treten dorsal der Antennalloben der laterale l-ACT, der mediale m-ACT und dazwischen drei ml-ACTs aus (Mobbs, 1982; Abel et al., 2001; Kirschner et al., 2006). Alle erwähnten PNs bleiben ipsilateral. Die uniglomerulären PNs (uPNs) des l-ACTs orientieren sich, aus dem Antennallobus kommend, zuerst nach lateral und ziehen schließlich lateral des v-Lobus nach dorsal (Kirschner et al., 2006: Abb. 6). Kollaterale zweigen auf diesem Weg ins laterale Horn (LH) ab. Zudem terminieren Kollaterale am distalen Ende des Pedunculus und ventral der Calyces in den Basalringen und Lippenregionen. In den gleichen Regionen, jedoch innerhalb dieser in abweichenden Bereichen, enden Kollaterale des m-ACTs. Die ebenfalls uniglomerulären PNs führen aus dem Antennallobus austretend zunächst median des v-Lobus nach dorsal, senden am distalen Ende des Pedunculus parallel, aber in entgegengesetzter Richtung zum l-ACT laufend ihre Kollaterale in die Calyces und ziehen weiter lateral des v-Lobus nach ventral ins LH, wo sie enden. Die drei ml-ACTs bestehen aus multiglomerulären PNs (mPNs). Der ml-ACT1 führt auf kürzestem Weg ins LH. Die zwei verbleibenden ml-ACTs 2 und 3 ziehen ventral des v-Lobus ebenfalls ins LH. Dabei passieren sie zusammen ein Neuropil, in das sie intensiv Kollaterale entsenden und das Kirschner et al. (2006) als „*lateral bridge*“ bezeichneten. Im gleichen Bereich befinden sich extrinsische Neurone des v-Lobus (Rybak and Menzel, 1993; Strausfeld, 2002; Kirschner et al., 2006). Bevor die zwei Trakte die „laterale Brücke“ erreichen, durchkreuzen sie teilweise das nach Kirschner et al. (2006) bezeichnete „*triangle*“, das einen Kreuzungsbereich der entsprechenden Fasern darstellt und sich im Zentrum des lateralen Protocerebrallappens (LPL) befindet. Hier zweigen auch Axone zum Eintritt ins Ringneuropil ab. Die „*lateral bridge*“, das „*triangle*“ und das Ringneuropil fassen die Forscher als „*lateral network*“ zusammen. Interessanterweise befinden sich bei der exemplarischen Honigbiene im eben erklärten olfaktorischen System zahlreiche PDF-Fasern. Auch die in Kirschner et al. (2006) be-

schriebenen Gewebetiefen, in denen sich die Strukturen befinden, stimmen überein. So startet das Ringneuropil zwischen 40 und 100  $\mu\text{m}$  und endet bei etwa 180  $\mu\text{m}$  Tiefe, das „PDF-Ringneuropil“ zieht aus dem VLP bei 80  $\mu\text{m}$  zusammen und beginnt die v-Lobus-Umrundung bei 105 und beendet sie bei 145  $\mu\text{m}$  (Beschreibung siehe 3.3.4.4 ab S. 110). Das „Kirschner“-Triangel liegt zwischen 110 und 170  $\mu\text{m}$ , das entsprechende PDF-Verzweigungsareal des VLPs dringt bis 175  $\mu\text{m}$  ins Gewebe ein. Wie schon im visuellen System betreffen die Projektionsgebiete vermutlich hauptsächlich Neurone höherer Ordnung. Außerdem konnte ein intensives Netz an PDF-Neuriten unterhalb der Calyces am distalen Ende der Pedunculi und gleichzeitig am superficialen Rand des Protocerebrums immunreaktiv gefärbt werden (Rekonstruktionen ab Abb. 3.44, S. 106), einem Bereich, in dem der l- und der m-ACT verlaufen könnten. Bei der Biene existieren zudem zwei PDF-Fasern in der linken Hemisphäre, die sich zwischen dem lateralen und medianen Calyx hindurchschieben (Abb. 3.48, S. 107). Auch das laterale Horn wird von PDF-Neuriten versorgt (Abb. 3.62, G–K, S. 117/118). Besonders intensiv verzweigt und nicht nur superficial, sondern ins Neuropil hineinragend, scheint sich das PDF-Projektionsnetzwerk in dem nach Kirschner et al. (2006) bezeichneten „*lateral network*“ auszuprägen. So zeigen die Rekonstruktionen dichte Verzweigungen konzentriert im Bereich des VLPr (Abb. 3.44, S. 106) und einem Kreuzungsbereich, der unter anderem ins Ringneuropil übergeht und diesem folgt (weiß-blau gepunkteter Pfeil und dunkelblaue Fasern in Abb. 3.54, S. 111). Eine tatsächliche Überlappung bzw. ein funktionell erreichbares Nebeneinander der olfaktorischen PNs mit den PDF-Fasern müsste in Färberversuchen getestet werden, genauso wie eine eventuelle Beeinflussung z. B. des Axondurchmessers der PNs, eine rhythmische Entleerung der DCVs oder die Verteilung und Lokalisation der PDF-Rezeptoren. Die Angaben zur Tiefe im Neuropil des „*triangle*“, der „*lateral bridge*“ und des Ringneuropils bei Kirschner et al. (2006) decken sich mit den Vermessungen zur Lokalisierung der PDF-Fasern bei der exemplarischen Honigbiene (Werte siehe 3.3.4.4). Unter der Annahme, dass es eine Überlappung gibt, spricht die anatomische Verteilung der PDF-Fasern in Erinnerung an die Situation im visuellen System für eine Sensitivitätseinstellung bezüglich der Übertragung spezieller Output-Rhythmen der Inneren Uhr. Der Output über die uPNs erhält Input von speziellen Sets an Glomeruli, getrennt in hemisphärischen Clustern, und basiert damit vielleicht auf bestimmten Geruchsinformationen.

Im primären olfaktorischen Zentrum, den Antennalloben, erreichen die PDF-Neuriten bei der Honigbiene ausschließlich einen speziellen Glomeruli-Bereich, dem der in der dorsal-caudalen Hemisphäre liegende T4-Cluster zugeordnet werden kann (Galizia et al., 1999). Dabei handelt es sich allem Anschein nach um D02, D03, D05 und D06 (siehe 3.3.4.7, S. 126). Die Efferenz erfolgt bei diesen Knäulchen, außer bei D02, bei dem weder zum m- noch zum l-ACT Verbindungen gefärbt sind, über den m-ACT (Kirschner et al., 2006).



Aufgrund anatomischer Besonderheiten vermuten Kirschner et al. (2006), dass die T4-Glomeruli nicht den Geruch, sondern „andere sensorische Modalitäten (Geschmack, Temperatur, Feuchtigkeit) oder Gerüche in anderer Art und Weise verarbeiten“. Die Wissenschaftler erwähnen neben D01 und D08 auch D02 als „guten Kandidaten für ein nicht-olfaktorisches oder multimodales Glomeruli“. Auch Abel et al. (2001) publizierten, dass bestimmte Neurone innerhalb der T4-Region nicht auf Geruch, dafür auf eine „Kontakt-Chemorezeption“ mit Bienenwachs reagieren. Die unterschiedlichen Peaks bei den PDF-Oszillationsversuchen in den diversen Faserbereichen (Abb. 4.5, S. 138; Abb. 4.11, S. 145; Abb. 4.16, S. 154) wecken den Verdacht, dass es sich um verschiedene Outputrhythmen handeln könnte wie z. B. verschiedene Sinneswahrnehmungen oder Verhaltensweisen. Erwähnenswert ist, dass nach Gronenberg (2001) und Kirschner et al. (2006) die Lippenregion und die innere Hälfte des Basalrings olfaktorischen, der Kragen und die äußere Hälfte des Basalrings visuellen Input erhalten. Vielleicht fungiert PDF bei der Synchronisation der Empfindlichkeitseinstellung verschiedener Sinneswahrnehmungen.

Die mikroskopischen Bilder zu den PDF-Färbungen in der T4-Region lassen Unsicherheiten in Bezug auf die Zuordnung offen. So könnten die PDF-Fasern innerhalb des T4-Traktes, am Rand der Glomeruli oder im Bereich des „*dorsal lobe*“ verlaufen. Die Fasern scheinen weniger auf Höhe des m-ACTs als mehr im „*median bundle*“ in den Antennallobus einzutreten (Abb. 3.77, B, S. 127, vgl. mit Abbildungen in Abel et al., 2001; Kirschner et al., 2006). Mehrfachfärbungen, die die Zugehörigkeiten entsprechender Strukturen erlauben, sollten diesbezüglich angestrebt werden.

Auch bei der Schabe *Leucophaea maderae* konnten Wei et al. (2010) PDF-Fasern entdecken, die nahe der posterioren Oberfläche des Antennallobus terminieren, bei denen sie aber keine PDF-Somata zuordnen konnten. Im Gegensatz zur Honigbiene verlaufen diese Fasern eindeutig außerhalb des Antennallobus.

Aus den olfaktorischen Projektionen resultieren vier Kompartimente im lateralen Horn (LH; Kirschner et al., 2006). Die PDF-Fasern terminieren nur im dorsalen Teil des LHs (Abb. 3.62, G–H, S. 117/118, deutlich ausgeprägt im linken LH im Bild rechts), nach Kirschner et al. (2006) der rostral gelegene Bereich. Eine präzise Zuordnung müsste auch hier über Parallelfärbungen erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Dissertation wurde das Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera* auf mögliche Oszillationen des Neuropeptids „*Pigment-Dispersing Factor*“ (PDF) untersucht. Der Schwerpunkt lag zunächst in potenziellen Unterschieden zwischen diurnal rhythmischen Sammelbienen und rund um die Uhr tätigen Stockbienen. Schließlich wurde geprüft, ob die entdeckten PDF-Oszillationen im Gehirn der Sammelbiene endogen gesteuert oder durch den exogenen Zeitgeber Licht beeinflusst werden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Antiserum gegen das in Crustaceen vorkommende „*Pigment-Dispersing Hormone*“ (PDH; Dircksen et al., 1987). Mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (cLSM) wurden die Daten erfasst und anschließend mit der Computersoftware ImageJ die PDF-immunreaktiven Färbeintensitäten bestimmt sowie die PDF-Zellen ausgezählt.

Der zweite Abschnitt beschäftigte sich mit der Lokalisierung der in der Biene hypothetischen Uhrmoleküle PER, TIM und CRY. Dafür kamen speziell im Labor von Guy Bloch, Hebron Universität in Jerusalem, entwickelte Antikörper zum Einsatz.

Im dritten Komplex wurde das PDF-Netzwerk eines exemplarischen Sammelbienen-gehirns mit der Computersoftware Amira<sup>®</sup> dreidimensional rekonstruiert.

In den Gehirnen von Sammel- und Stockbienen sind unter LD 12:12 tendenziell PDF-Oszillationen in der Anzahl der PDF-Neurone und in der PDF-immunreaktiven Färbeintensität in den PDF-Zellkörpern sowie deren Neuriten vorhanden. Die zeitlichen Oszillationen verlaufen in beiden prinzipiell gleich. Grundsätzlich befindet sich der niedrigste Wert am Tagesanfang beim Wechsel von Dunkel nach Hell.

Bei Stockbienen zeigen sich in allen untersuchten Zellen und Fasern zueinander synchrone PDF-Oszillationen. Bei Sammelbienen dagegen existieren zeitlich versetzt differenzierte PDF-Zyklen, die als unterschiedliche Signale in verschiedene Gehirnregionen für die komplexeren Verhaltensweisen bzw. Aufgaben angesehen werden können. Dies spricht für eine Reorganisation der PDF-Oszillationsrhythmen beim Wechsel vom arrhythmischen Stockbienen- zum diurnalen Sammelbienenstadium.

Stockbienen haben zudem zu allen Zeitpunkten signifikant weniger PDF-Zellen mit einer niedrigeren PDF-immunreaktiven Färbeintensität als Sammelbienen. Bei Stockbienen konnten in dem Zellcluster nahe der Medulla in beiden Gehirnhälften zusammen maximal 26 (pro Hemisphäre 13), bei Sammelbienen 30 PDF-Neurone (15) bestimmt werden. Die Reduktion des Tiefstwertes ist bei Stockbienen mit bis zu 12 Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei Sammelbienen mit lediglich 4. Das lässt vermuten, dass die Plastizität des

Verhaltens mit der Anzahl an PDF-exprimierenden Neuronen in Zusammenhang stehen könnte.

Umgekehrt fällt bei den Sammelbienen die Amplitude in der zeitlichen Oszillation der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone deutlich stärker aus als bei den Stockbienen, wobei sich der Tiefstwert bei beiden Gruppen auf gleich niedrigem Niveau befindet. In den Zytoplasmen beider Gruppen herrschen jedoch keine signifikanten PDF-Oszillationen, wohl aber in deren Neuriten. Als signifikant erwiesen sich zunächst alle untersuchten Faserbereiche, schließlich im Sammelbienenhirn nur noch zwei Faserbereiche: die Fasern in der „*serpentine layer*“ der Medulla und im „Loop“, dem Faserbündel zwischen Zentralhirn und Lobula. Diese Ergebnisse sprechen für einen rhythmisierenden Prozess bei dem Transport, der Anreicherung oder der Freisetzung des Neuropeptids in den Zellfortsätzen oder an den Terminalen.

Unter DD bestätigt sich die signifikante Oszillation der PDF-Färbeintensität in den Fasern der Medulla bei den Sammelbienen, was Rückschlüsse auf einen endogenen Rhythmus zulässt. Es stellt sich zudem die Oszillation der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone als signifikant heraus. Dieses Ergebnis könnte auf eine Maskierung des endogenen PDF-Rhythmus durch den exogenen Zeitgeber Licht hinweisen. Der Peak unter DD bei CT22 wird signifikant von größeren Zellen ( $> 280 \mu\text{m}^2$  Querschnittsfläche), der unter LD bei ZT6 tendenziell von kleineren Zellen ausgeprägt. Die etwa um einen halben Tag versetzt verlaufenden Kurven sprechen für eine Maskierung.

Grundsätzlich sind die PDF-Zellen in einem Zellhaufen ballenartig kumuliert. Tendenzen zur Clusterbildung oder zur verstreuten Anordnung von Einzelzellen sind erkennbar, jedoch nicht regelmäßig. Die Größen variieren ohne Präferenzen zu bestimmten Verhältnissen zwischen ca.  $60$  und  $700 \mu\text{m}^2$  Querschnittsfläche.

Der zeitliche Verlauf der PDF-Zellanzahl in Gehirnen von Sammelbienen unterscheidet sich nicht unter LD und DD. In beiden Fällen ist er nicht signifikant, verläuft aber tendenziell ähnlich.

Zu versetzten Zeitpunkten erscheinende Peaks bei der Oszillation der PDF-Färbeintensität in den verschiedenen Faserbereichen könnten mit unterschiedlichen Output-Rhythmen bei der Sensitivitätseinstellung diverser Sinneswahrnehmungen oder Verhaltensweisen zusammenhängen.

In Gehirnen der Sammelbiene konnten weder CRY-, TIM- noch PER-Neurone identifiziert und damit keine Kolo-kalisation mit den PDF-Neuronen festgestellt werden.

Die dreidimensionale Rekonstruktion verdeutlicht, dass PDF beinahe in das gesamte Protocerebrum sowie die optischen Loben, die Ozellen und die Antennalloben projiziert.

Nicht vertreten ist es in den Pilzkörpern und im anterioren optischen Tuberkel. Die PDF-Färbung kommt im Honigbienenhirn fast ausschließlich in Varikositäten vor.

Von dem PDF-Cluster anterior der Medulla ziehen die Neuriten einerseits nach lateral außen in den optischen Lobus und andererseits nach median in ein Faserbündel, das zwischen Lobula und Protocerebrum am medianen Rand der Lobula nach posterior zieht („Loop“), und in den Protocerebrallappen.

Im optischen Lobus konzentrieren sich die Fasern auf die „*serpentine layer*“ der Medulla und das Stratum C in der Lamina, wobei sie die komplette dorsoventrale Ausdehnung der Neuropile umfassen. Auffallend viele PDF-Neuriten existieren in der vermutlichen „*dorsal rim area*“ (DRA). Um die dorsale Hälfte der Lobula laufen wenige PDF-Fasern posterior herum und treten dann ebenfalls in das Medullanetz ein.

Der „Loop“ geht in die im Bienenhirn auffallende „*posterior optic commissure*“ (POC) über und verlängert sich zudem in den posterioren Bereich des Protocerebrums. Die POC verbindet beide optische Loben miteinander und zieht kontralateral, sich jeweils auf der dorsalen und ventralen Seite verzweigend, in die Medulla.

In den Ozellen beschränken sich die PDF-Neuriten auf den ventralen Bereich. Die Projektionen sind in der medianen Ozelle viel deutlicher ausgeprägt als in den lateralen Ozellen. In die Antennalloben erstrecken sich vereinzelte PDF-Fasern nur in den dorsalen und posterioren Bereich.

Im Protocerebrum verläuft das PDF-Netz überwiegend superficial. In tiefere Gewebeschichten reicht es vor allem im „*ventral lateral*“ (VLPr) und im „*inferior lateral protocerebrum*“ (ILPr). Vermutlich ziehen von den PDF-Zellen sogenannte Plexen in verschiedene Areale des Protocerebrums, von denen einige „blind“ terminieren und einige Verbindungen mit anderen Plexen zeigen sowie über Kommissuren mit kontralateral verknüpft sind. Zahlreiche Kommissuren verbinden die beiden Gehirnhälften dorsal und ventral. Das Verteilungsmuster spricht für eine großflächige Verteilung von PDF, vor allem in Bereichen, die mit der olfaktorischen und visuellen Sinnesverarbeitung verknüpft sind. Über die Kommissuren kann es zur Synchronisation beider Gehirnhälften kommen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

a	anterior	LPL	<i>lateral protocerebral lobe</i> , lateraler Protocerebrallappen
ACT	<i>antennocerebral tract</i> , Antennocerebraltrakt	LVT	<i>lobula-valley-tract</i>
AK	Antikörper	LY	<i>Luzifer Yellow</i>
AL	<i>antennal lobe</i> , Antennallobus	m	median
ALFP	<i>anterior lateral fiber plexus</i>	MB	<i>mushroom body</i> , Pilzkörper
aMe	<i>accessory medulla</i> , akzessorische Medulla	MBu	<i>median bundle</i> , medianes Bündel
AOC	<i>anterior optic commissure</i> , anteriore optische Kommissur	MC	<i>median calyx</i> , medianer Calyx
AOT	<i>anterior optic tubercle tract</i>	Me	Medulla
AOTu	<i>anterior optic tubercle</i> , anteriores optisches Tuberkel	mf	<i>median furrow</i> , mediane Furche
BMAL	<i>brain and muscle aryl hydro- carbon receptor nuclear trans- locator (ARNT)-like</i>	m-L	<i>medial lobe</i> , medialer Lobus
CB (ld, ud)	<i>central body</i> , Zentralkörper ( <i>lower, upper division</i> ; unterer, oberer Teil)	MOc	<i>median ocellus</i> , mediane Ozelle
Clk, CLK	<i>Clock-Gen</i> , CLOCK-Protein	NDS	<i>Normal Donkey Serum</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , konfokales LSM	NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
co	<i>collar of the calyx</i> , Kragenregion des Calyx	No	<i>noduli</i> , Noduli
CRY	CRYPTOCHROM	Oc	<i>ocelli</i> , Ozellen
CT	<i>Circadian Time</i>	Oe	Oesophagus
cyc, CLC	<i>cycle-Gen</i> , CYCLE-Protein	p	posterior
d	dorsal	PB	Phosphatpuffer (Natrium-Phosphatpuffer)
DBT	DOUBLE-TIME	PBr	<i>protocerebral bridge</i> , Protocerebrallücke
Dc	Deutocerebrum	PBT	Phosphatpuffer mit Triton X-100
DD	<i>dark-dark</i> , Dauerdunkel	Pc	Protocerebrum
DL	<i>dorsal lobe</i>	PDF/PDH	<i>Pigment-Dispersing Factor / Pigment-Dispersing Hormone</i>
DN	<i>dorsal neuron</i> , Dorsalneuron	PDP1	PAR domain 1 $\epsilon$ -Protein
GABA	<i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> , $\gamma$ -Aminobuttersäure	Pe	<i>peduncle</i> , Pedunculus
ILPr	<i>inferior lateral protocerebrum</i>	per, PER	<i>period-Gen</i> , PERIOD-Protein
IMPr	<i>inferior medial protocerebrum</i>	PFA	Paraformaldehyd
l	lateral	PI / PL	Pars intercerebralis / lateralis
La	Lamina	PL	<i>protocerebral lobe</i> , Protocerebrallappen
LAL	<i>lateral accessory lobe</i>	PN (u-, m-)	<i>projection neurons</i> , Projektions- neurone (uni-, multiglomerulär)
LC	<i>lateral calyx</i> , lateraler Calyx	POC	<i>posterior optic commissure</i> , posteriore optische Kommissur
LD	<i>light-dark</i> , Licht-Dunkel-Wechsel	POT	<i>posterior optic tract</i>
LH	<i>lateral horn</i> , laterales Horn	QMP	<i>queens mandibular pheromone</i>
li	<i>lip of the calyx</i> , Lippenregion des Calyx	SCN	Suprachiasmatischer Nukleus
LL	<i>light-light</i> , Dauerlicht	SLPr	<i>superior lateral protocerebrum</i>
LN (l-, s-)	<i>lateral neuron (large-, small-)</i> , Lateralneuron (großes, kleines)	SMPr	<i>superior medial protocerebrum</i>
Lo	Lobula	TALT	<i>tubercle accessory lobe tract</i>
LOc	<i>lateral ocellus</i> , laterale Ozelle	Tc	Tritocerebrum
		tim, TIM	<i>timeless-Gen</i> , TIMELESS-Protein
		TrX	TritonX-100
		v	ventral
		v-L	<i>vertical lobe</i> , vertikaler Lobus
		VLP	<i>ventrolateral plexus</i>
		VLPr	<i>ventral lateral protocerebrum</i>
		vri, VRI	<i>vrille-Gen</i> , VRI-Protein
		ZT	<i>Zeitgeber Time</i>

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schema eines circadianen Systems.....	1
Abb. 1.2:	Das circadiane Schrittmachersystem im Gehirn von <i>D. melanogaster</i> .....	8
Abb. 1.3:	Schematisiertes Modell für die relativen, molekularen Uhrgen-mRNA-Oszillationen im Gehirn von Sammelbienen .....	13
Abb. 1.4:	Schematisches Modell des molekularen Uhrwerks bei der Honigbiene.....	13
Abb. 1.5:	Das PDF-Netzwerk im Gehirn der Schabe <i>Leucophaea maderae</i> .....	16
Abb. 1.6:	Der optische Lobus mit den PDF-Neuronen von <i>Leucophaea maderae</i> .....	17
Abb. 1.7:	Die PDF-Neuriten im lateralen Protocerebrum der Schabe <i>Leucophaea maderae</i> .....	17
Abb. 2.1:	Der „Bienensauger“ .....	29
Abb. 2.2:	Käfig für das Entrainen der Honigbienen.....	30
Abb. 2.3:	Präparation des Honigbienengehirns (schematisch) .....	32
Abb. 2.4:	Schneiden am Vibratom.....	33
Abb. 2.5:	Die zur Oszillation und Quantität untersuchten Bereiche im Gehirn von <i>Apis mellifera</i> .....	46
Abb. 2.6:	Organisation der Amira <sup>®</sup> -Software.....	49
Abb. 2.7:	„Crop Editor“-Eingabe .....	50
Abb. 2.8:	Nachgezeichnete Neuropilstrukturen im „Segmentation Editor“.....	51
Abb. 2.9:	Neuropil-Visualisierung der oberen Gehirnhälfte.....	51
Abb. 2.10:	Die „Surface Generierung“ .....	52
Abb. 2.11:	Demonstration des Faserzeichnens im Antennallobus .....	55
Abb. 2.12:	Varianten der Neuritenrekonstruktion .....	56
Abb. 2.13:	Projektion eines Teils des „Loops“ .....	56
Abb. 2.14:	LandmarkView .....	58
Abb. 2.15:	Die „Rigid Transformation“ .....	58
Abb. 2.16:	Die „Pool“-Struktur bei der „Landmark“-Methode .....	58
Abb. 2.17:	Gegenüberstellung CLSM-Originalaufnahmen/Amira <sup>®</sup> -Rekonstruktion: PDF-Somata ..	60
Abb. 2.18:	Gegenüberstellung CLSM-Originalaufnahmen/Amira <sup>®</sup> -Rekonstruktion: POC, „Loop“ ..	62
Abb. 2.19:	Gegenüberstellung CLSM-Orig.-Aufn./Amira <sup>®</sup> -Rek.: dorsolat. Protocerebrallappen ..	62
Abb. 3.1:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (vier Zeitpunkte).....	66
Abb. 3.2:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (sechs Zeitpunkte) .....	70
Abb. 3.3:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD (sechs Zeitpunkte).....	72
Abb. 3.4:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD (Aufteilung der PDF-Neurone in drei und zwei Größenklassen; Trennung bei 300 $\mu\text{m}^2$ ).....	74
Abb. 3.5:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD (Aufteilung der PDF-Neurone in zwei Größenklassen; Trennung bei 280 $\mu\text{m}^2$ ; 250 $\mu\text{m}^2$ ) .....	75
Abb. 3.6:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD (sechs Zeitpunkte) .....	77
Abb. 3.7:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD (Aufteilung der PDF-Neurone in drei und zwei Größenklassen; Trennung bei 300 $\mu\text{m}^2$ ).....	79
Abb. 3.8:	PDF-Oszillationen in Gehirnen von Sammelbienen unter DD (Aufteilung der PDF-Neurone in zwei Größenklassen; Trennung bei 280 $\mu\text{m}^2$ ; 250 $\mu\text{m}^2$ ) .....	80
Abb. 3.9:	Doppelfärbung mit anti-PDH und anti-PER .....	81
Abb. 3.10:	Räumliche Ebenen im rekonstruierten Bienengehirn .....	82
Abb. 3.11:	Neuropiler Aufbau des Honigbienengehirns .....	84
Abb. 3.12:	PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene in einheitlich weißer Farbe .....	89
Abb. 3.13:	PDF-Netzwerk im Gehirn der Honigbiene in differenzierten Farben .....	90
Abb. 3.14:	Übersicht: Die PDF-Neurone und ihre Projektionen. Rechte Hemisphäre, anterior.....	91
Abb. 3.15:	Neuriten, die von den PDF-Neuronen wegziehen. Rechte Hemisphäre, dorsal .....	92
Abb. 3.16:	Neuriten, die sich von den PDF-Neuronen in den PL verzweigen und zum „Loop“ führen. Rechte Hemisphäre, von dorsomedian nach lateral außen .....	92
Abb. 3.17:	Die von den PDF-Neuronen ins Protocerebrum und in den „Loop“ projizierenden Neuriten. Rechte Hemisphäre, dorsal.....	92
Abb. 3.18:	Übersicht: PDF-Neurone und ihre Projektionen. Linke Hemisphäre, anterior .....	93
Abb. 3.19:	Die von den PDF-Neuronen ins Protocerebrum und in den „Loop“ projizierenden Neuriten. Linke Hemisphäre, dorsal .....	93
Abb. 3.20:	Lage der PDF-Somata und des „Loops“ im Honigbienengehirn.....	93
Abb. 3.21:	Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, dorsomedian. Integriert: „Kante“; Verlauf im Inneren der Lobula als Artefakt .....	94

Abb. 3.22: Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, ventromedian.....	94
Abb. 3.23: Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula. Linke Hemisphäre, anterior .....	94
Abb. 3.24: Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula. Rechte Hemisphäre, von median .....	95
Abb. 3.25: Verlauf des „Loops“ am Rand der Lobula mit weiterführenden Projektionen. Rechte Hemisphäre, dorsal.....	95
Abb. 3.26: Weiterführende Projektionen des „Loops“. Linke Hemisphäre, dorsomedian .....	96
Abb. 3.27: Weiterführende Projektionen des „Loops“. Rechte Hemisphäre, dorsomedian .....	96
Abb. 3.28: Übergänge „Loop“/„Medulla“-Fasern. Linke Hemisphäre, dorsomedian .....	97
Abb. 3.29: Übergänge „Loop“/„Medulla“-Fasern .....	97
Abb. 3.30: Lage der posterioren optischen Kommissur (POC) im Honigbienen Gehirn.....	97
Abb. 3.31: Die POC verläuft parallel zum „Loop“ .....	97
Abb. 3.32: Die posterior gelegene Schleife des „Loops“. Linke Hemisphäre, dorsoanterior. ....	98
Abb. 3.33: PDF-Neuriten in den optischen Loben, anterior .....	98
Abb. 3.34: Optischer Lobus mit PDF-Neuriten, anterior.....	99
Abb. 3.35: Die transparent dargestellte Medulla mit der Serpentine Layer .....	100
Abb. 3.36: PDF-Projektionsmuster im Bereich der Lobula. Rechte Hemisph., posterior-median..	100
Abb. 3.37: PDF-Projektionsmuster im Bereich der Lobula. Linke Hemisph., posterior-median ....	100
Abb. 3.38: Kontaktstellen „Lobula“- / Medulla-Fasern.....	100
Abb. 3.39: Kontaktstellen POC / „Loop“ / „Lobula“- / Medulla-Fasern .....	100
Abb. 3.40: PDF-Projektionsmuster in der Lamina.....	102
Abb. 3.41: PDF-Projektionsmuster in der Lamina im Detail.....	103
Abb. 3.42: Der posteriore Verlauf der Fasern in der Lamina, von lateral außen. ....	103
Abb. 3.43: PDF-Fasern im Protocerebrum und dessen differenzierte Areale.....	104
Abb. 3.44: PDF-Netzwerk im rechten Protocerebrallappen, anterior.....	106
Abb. 3.45: PDF-Netzwerk im rechten Protocerebrallappen, lateral. ....	106
Abb. 3.46: PDF-Netzwerk im linken Protocerebrallappen, anterior. ....	106
Abb. 3.47: Mögliche PDF-Innervation in die Antennalloben .....	107
Abb. 3.48: PDF-Neuriten dorsal im Protocerebrum zwischen den Calyces.....	107
Abb. 3.49: Das „Triangel“ von posterior hinter dem m-Lobus .....	108
Abb. 3.50: Das „Triangel“ posterior der Pilzkörper, von anterior.....	108
Abb. 3.51: Das „Triangel“ posterior der m-Loben, von posterior.....	108
Abb. 3.52: Das differenzierte protocerebrale PDF-Netzwerk, von anterolateral .....	110
Abb. 3.53: Der superficiale ALFP, von ventromedian .....	111
Abb. 3.54: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, anterior .....	111
Abb. 3.55: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL ohne ALFP, anterior.....	111
Abb. 3.56: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, seitliche Plexen, VLP, anterolateral ....	112
Abb. 3.57: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL ohne ALFP, anterior.....	112
Abb. 3.58: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, posterior. ....	112
Abb. 3.59: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL, dorsal. ....	113
Abb. 3.60: Differenzierte Rekonstruktion des rechten PL mit posteriorer Projektion, dorsal .....	116
Abb. 3.61: Die anterioren optischen Tuberkel (AOTu), von dorsal .....	116
Abb. 3.62: Die mikroskopischen Aufnahmen überlagert mit rekonstruierten PDF-Neuriten.....	118
Abb. 3.63: Kreuzungsbereich lateral des dorsalen Stranges der dorsalen „Doppelkommissur“ ...	119
Abb. 3.64: Kreuzungsbereich lateral des ventralen Stranges der dorsalen „Doppelkommissur“ ..	119
Abb. 3.65: Aus der posterior-ventralen Kommissur ziehen PDF-Neuriten in die Antennalloben...	122
Abb. 3.66: Die „ <i>posterior optic commissure</i> “ (POC) und die Neuriten des „Triangels“, posterior ..	122
Abb. 3.67: Die POC von ventral / Übergänge mit dem „Triangel“ .....	122
Abb. 3.68: PDF-Neuriten in den Ozellen, von anterior.....	124
Abb. 3.69: Die ozellaren Trakte, von lateral .....	124
Abb. 3.70: PDF-Neuriten in den ozellaren Trakten, von posterior .....	124
Abb. 3.71: PDF-Projektionen in den Ozellen, von lateral.....	124
Abb. 3.72: Ozellare PDF-Neuriten, POC, post. Strang der ventr. „Doppelkommissur“, lateral.....	125
Abb. 3.73: Die PDF-Fasern im Bereich des „ <i>central body</i> “ (CB), dorsal .....	125
Abb. 3.74: Die ozellaren PDF-Neuriten posterior des CBs, von anterior. ....	125
Abb. 3.75: Die PDF-Fasern im Antennallobus, von anterior .....	127
Abb. 3.76: Die PDF-Fasern im Antennallobus, von dorsal.....	127
Abb. 3.77: Antennalloben mit PDF-Neuriten (mikroskopische Bilder) .....	127
Abb. 4.1: PDF-Zellanzahl in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (4 Zeitpunkte) sowie durchschnittl. PDF-Zellanzahl beider Arbeitergruppen.....	128
Abb. 4.2: Diverse Anordnungen der PDF-Neurone im Honigbienen Gehirn .....	131



Abb. 4.3:	Inhomogene PDF-Verteilung im Zytoplasma.....	131
Abb. 4.4:	Färbeintensitäten der PDF-Somata in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (4 Zeitpunkte) sowie die durchschnittl. PDF-Färbeintensität beider Arbeitergruppen ..	134
Abb. 4.5:	Färbeintensitäten der PDF-Somata und der PDF-Fasern in Gehirnen von Stock- und Sammelbienen (4 Zeitpunkte).....	138
Abb. 4.6:	Anzahl der PDF-Somata in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (6 Zeitpunkte) sowie die durchschnittl. Anzahl beider Arbeitergruppen.....	139
Abb. 4.7:	Beispiele für Anomalien in geschädigten Gewebeproben .....	140
Abb. 4.8:	PDF-Färbeintensität der PDF-Zytoplasmen in Gehirnen von Sammel- und Stockbienen (6 Zeitpunkte) sowie die durchschnittl. PDF-Färbeintensität beider Arbeitergruppen ..	140
Abb. 4.9:	Anzahl und die PDF-Färbeintensitäten der PDF-Somata in Gehirnen von Sammelbienen (4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 2) Zeitpunkte) .....	143
Abb. 4.10:	Anzahl und PDF-Färbeintensitäten der PDF-Somata in Gehirnen von Stockbienen (4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 2) Zeitpunkte) .....	143
Abb. 4.11:	Färbeintensitäten der PDF-Neuriten (mittels „squares 5x5 pixel“) in unterschiedlichen Bereichen der Gehirne von Stock- und Sammelbienen (6 Zeitpunkte) .....	145
Abb. 4.12:	Anzahl und PDF-Färbeintensitäten der PDF-Somata in Gehirnen von Sammelbienen im zweiten und dritten Experiment .....	146
Abb. 4.13:	PDF-Färbeintensitäten in diversen Faserbereichen verglichen mit Oszillationen in den Zytoplasmen der PDF-Somata und in der PDF-Zellanzahl im Sammelbienenhirn unter LD 12:12 .....	148
Abb. 4.14:	PDF-Färbeintensitäten im Zytoplasma und in den Fasern sowie PDF-Zellanzahl unter LD 12:12 im Sammelbienenhirn (4 (Exp. 1) und 6 (Exp. 3) Zeitpunkte) .....	150
Abb. 4.15:	PDF-Färbeintensität bei Sammelbienen unter LD 12:12 und DD.....	154
Abb. 4.16:	PDF-Färbeintensitäten der Faserbereiche und der Zytoplasmen der PDF-Neurone in Gehirnen von Sammelbienen unter DD .....	154
Abb. 4.17:	PDF-Färbeintensitäten in den Faserbereichen im Sammelbienenhirn unter LD 12:12 und DD .....	155
Abb. 4.18:	Anzahl an PDF-Neuronen in Gehirnen von Sammelbienen unter LD 12:12 und DD ...	156
Abb. 4.19:	Lamina- und Medulla-Stratifikation im optischen Lobus .....	166

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Übersicht über die durchgeführten Experimente .....	25
Tab. 2.2:	Versuche und abgedeckte Zeitpunkte im fünften Experiment.....	28
Tab. 2.3:	Färbeparameter für die Experimente 1 bis 4 zur Oszillation von PDF-Neuronen .....	35
Tab. 2.4:	Färbeparameter zur Lokalisation von TIM-, PER- und CRY-Neuronen (5. Exp.).....	36
Tab. 2.5:	Färbeparameter für die 3D-Rekonstruktion des PDF-Netzwerks im Ganzhirn .....	37
Tab. 2.6:	Unterschiedliche Färbeparameter zwischen allen Versuchen.....	38
Tab. 2.7:	Farbliche Kanäle, Absorptions- (Amax.) sowie Emissionsmaxima (Emax.) für die verschiedenen sekundären Antikörperfärbungen (AK 2).....	44
Tab. 2.8:	Die quantifizierten Faserbereiche in <i>Apis mellifera</i> .....	46
Tab. 2.9:	Verwendete Materialien und Geräte .....	63
Tab. 4.1:	Die Korrelationskoeffizienten (r) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammel- und Stockbienen im ersten Experiment .....	137
Tab. 4.2:	Die Korrelationskoeffizienten (r) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammel- und Stockbienen im zweiten Experiment .....	144
Tab. 4.3:	Die Korrelationskoeffizienten (r) zwischen der PDF-Zellanzahl bzw. der PDF-Färbeintensität in den Zytoplasmen der PDF-Neurone und den verschiedenen Faserbereichen bei Sammelbienen im dritten Experiment.....	149

## 6.4 Literaturverzeichnis

- Abdelsalam S., Uemura H., Umezaki Y., Saifullah A.S.M., Shimohigashi M. and Tomioka K. (2008): Characterization of PDF-immunoreactive neurons in the optic lobe and cerebral lobe of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 54: 1205-1212.
- Abel R., Rybak J. and Menzel R. (2001): Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Comparative Neurology* 437: 363-383.
- Allada R., White N.E., So W.V., Hall J.C. and Rosbash M. (1998): A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93: 791-804.
- Beier W. (1968): Beeinflussung der inneren Uhr der Bienen durch Phasenverschiebung des Licht-Dunkel-Zeitgebers. *Zeitschrift für Bienenforschung* 9: 356-378.
- Bellmann H. (2005): Bienen, Wespen, Ameisen – Hautflügler Mitteleuropas. Franckh-Kosmos-Verlags-GmbH Stuttgart.
- Blau J. and Young M.W. (1999): Cycling *vriple* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99: 661-671.
- Bloch G. and Robinson G.E. (2001): Reversal of honeybee behavioural rhythms. *Nature* 410: 1048.
- Bloch G., Toma D.P. and Robinson G.E. (2001): Behavioral rhythmicity, age, division of labor and *period* expression in the honey bee brain. *Journal of Biological Rhythms* 16: 444-456.
- Bloch G., Sullivan J.P. and Robinson G.E. (2002): Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 48: 1123-1131.
- Bloch G., Solomon S.M., Robinson G.E. and Fahrbach S.E. (2003): Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis mellifera*): age- and time-related plasticity. *The Journal of Comparative Neurology* 464: 269-284.
- Bloch G., Rubinstein C.D. and Robinson G.E. (2004): *period* expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 879-891.
- Bloch G. and Meshi A. (2007): Influences of octopamine and juvenile hormone on locomotor behavior and *period* gene expression in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* 193: 181-199.
- Bloch G., Shpigler H., Wheeler D.E. and Robinson G.E. (2009): Endocrine influences on the organization of insect societies. Vol. II. Non-mammalian hormone behavior systems, non-mammalian invertebrates. In: *Hormones, Brain, Behavior*. Pfaff D., Arnold A., Etgen A., Fahrbach S.E. and Rubin R., eds., pp 1027-1068, San Diego, CA, Academic Press.
- Bloch G. (2010): The social clock of the honeybee. *Journal of Biological Rhythms* 25: 307-317.
- Brady J. (1981): Behavioral rhythms in invertebrates. *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol.4: 125-144, Biological Rhythms (ed. Aschoff J.).
- Brandt R., Rohlfing T., Rybak J., Kroficzek S., Maye A., Westerhoff M., Hege H.-C. and Menzel R. (2005): Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *The Journal of Comparative Neurology* 492: 1-19.
- Brockmann A. and Robinson G.E. (2007): Central projections of sensory systems involved in honey bee dance language communication. *Brain, Behavior and Evolution* 70: 125-136.
- Bünning E. (1958): Tagesperiodische Bewegungen. *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. XVII, Part 1: 579-656.
- Campbell S.S. and Tobler I. (1984): Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 8: 269-300.
- Ceriani M.F., Darlington T.K., Staknis D., Mas P., Petti A.A., Weitz C.J. and Kay S.A. (1999): Light-dependent sequestration of TIMELESS by Cryptochrome. *Science* 285: 553-556.

- Clark D.P. und Pazdernik N.J. (2009): Molekulare Biotechnologie. Spektrum akad. Verlag Heidelberg.
- Crailsheim K., Hrassnigg N. and Stebentheiner A. (1996): Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). *Apidologie* 27: 235-244.
- Cyran S.A., Buchsbaum A.M., Reddy K.L., Lin M.C., Glossop N.R., Hardin P.E., Young M.W., Storti R.V. and Blau J. (2003): Vriille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112: 329-341.
- Dirksen H., Zahnow C.A., Keller R., Rao K.R. and Riehm J.P. (1987): The ultrastructure of nerve endings containing pigment-dispersing hormone (PDH) in crustacean sinus glands: identification by an antiserum against a synthetic PDH. *Cell Tissue Research* 250: 377-387.
- Dores R.M. and Herman W.S. (1981): Insect chromatophorotropic factors: the isolation of polypeptides from *Periplaneta americana* and *Apis mellifera* with melanophore-dispersing activity in the crustacean, *Uca pugnator*. *General and Comparative Endocrinology* 43: 76-84.
- Dudel J., Menzel R., Schmidt R.F. (2001): Neurowissenschaften – Vom Molekül zur Kognition. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Eban-Rothschild A. and Bloch G. (2008): Differences in the sleep architecture of forager and young honeybees (*Apis mellifera*). *The Journal of Experimental Biology* 211: 2408-16.
- Eban-Rothschild A. and Bloch G. (2012): Circadian rhythms and sleep in honey bees. In: Galizia C.G., Eisenhardt D. and Giurfa M. (2012): Honeybee Neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Ehnbohm K. (1948): Studies on the central and sympathetic nervous system and some sense organs in the head of neuropteroid insects. *Opuscula Entomologica Supplementum* 8: 1-162.
- Emery P., So W.V., Kaneko M., Hall J.C. and Rosbash M. (1998): CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669-679.
- Fernández M.P., Berni J. and Ceriani M.F. (2008): Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLOS Biology* 6: 518-524.
- Fischbach K.-F. and Dittrich A.P.M. (1989): The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell and Tissue Research* 258: 441-475.
- Flanagan D. and Mercer A.R. (1989): An atlas and 3-D reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 18: 145-159.
- Fleissner G., Fleissner G., Frisch B. (1993): A new type of putative non-visual photoreceptors in the optic lobe of beetles. *Cell and Tissue Research* 273: 435-445.
- Förster C. and Engelmann W. (1988): *Thalassomyxa australis* rhythmicity III. Entrainment by combination of different zeitgeber. *Journal of interdisciplinary Cycle Research* 19: 275-288.
- Free J.B., Ferguson A.W. and Simpkins J.R. (1992): The behaviour of queen honeybees and their attendants. *Physiological Entomology* 17: 43-55.
- von Frisch K. (1976): The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Galizia C.G., McIlwrath S.L. and Menzel R. (1999): A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Research* 295: 383-394.
- Giebultowicz J.M. (2001): Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 356: 1791-1799.
- Gilbert C. (1994): Form and function of stemmata in larvae of holometabolous insects. *Annual Review of Entomology* 39: 323-349.
- Glaser F.T. (2006): Temperatursynchronisation der circadianen Uhr von *Drosophila melanogaster*. Eine genetische und molekulare Untersuchung beteiligter Mechanismen und Rezeptoren. Dissertation – Naturwissenschaftliche Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin, der Universität Regensburg.

- Glaser F.T. and Stanewsky R. (2007): Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 72: 233-242.
- Goodman L.J. (1981): Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system. In: Autrum H. (Ed.), Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII 6B: 201-286. Springer Verlag Berlin.
- Gribakin F.G. (1975): Functional morphology of the compound eye of the bee. In: Horridge G.A. (ed): The compound eye and vision of insects. Clarendon Press, Oxford, 154-176.
- Grima B., Chélot E., Xia R. and Rouyer F. (2004): Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. Nature 431: 869-873.
- Gronenberg W. (1986): Physiological and anatomical properties of optical input-fibers to the mushroom body of the bee brain. Journal of Insect Physiology 32: 695-704.
- Gronenberg W. (2001): Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. The Journal of Comparative Neurology 435: 474-489.
- Grozinger C.M., Sharabash N.M., Whitfield C.W. and Robinson G.E. (2003): Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. PNAS 100: 14519-14525.
- Halberg F. (1959): Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung 10: 225-296.
- Hagberg M. (1986): Ultrastructure and central projections of extraocular photoreceptors in caddisflies (Insecta: Trichoptera). Cell and Tissue Research 245: 643-648.
- Hamasaka Y., Mohrher C.J., Predel R. and Wegener C. (2005): Chronobiological analysis and mass spectrometric characterization of pigment-dispersing factor in the cockroach *Leucophaea maderae*. The Journal of Insect Science 5: 43.
- Helfrich-Förster C. and Homberg U. (1993): Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. The Journal of Comparative Neurology 337: 177-190.
- Helfrich-Förster C. (1995): The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. PNAS 92: 612-616.
- Helfrich-Förster C. (1997): Development of pigment-dispersing hormone immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. The Journal of Comparative Neurobiology 380: 335-354.
- Helfrich-Förster C., Stengl M. and Homberg U. (1998): Organization of the circadian system in insects. Chronobiology International 15: 567-594.
- Helfrich-Förster C., Täuber M., Park J.H., Mühlig-Versen M., Schneuwly S. and Hofbauer A. (2000): Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Neuroscience 20: 3339-3353.
- Helfrich-Förster C. (2004): The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. Journal of Comparative Physiology A 190: 601-613.
- Helfrich-Förster C. (2005): PDF has found its receptor. Neuron 48: 161-169.
- Helfrich-Förster C., Shafer O.T., Wülbeck C., Grieshaber E., Rieger D. and Taghert P. (2007a): Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. The Journal of Comparative Neurology 500: 47-70.
- Helfrich-Förster C. (2007b): Immunohistochemistry in *Drosophila* – sections and whole mounts. Methods in Molecular Biology 362: 533-547, Humana Press Inc., Totowa.
- Heine H. (2009): Fälle für Freunde – Alle Geschichten aus Müllewapp. Carl Hanser Verlag München.
- Hendricks J.C., Sehgal A. and Pack A.I. (2000): The need for a simple animal model to understand sleep. Progress in Neurobiology 61: 339-351.
- Hermann C., Saccon R., Senthilan P.R., Domnik L., Dirksen H., Yoshii T. and Helfrich-Förster C. (2013): The circadian clock network in the brain of different *Drosophila* species. The Journal of Comparative Neurology 521: 367-388.

- Hertel H., Schäfer S. and Maronde U. (1987a): The physiology and morphology of visual commissures in the honeybee brain. *Journal of Experimental Biology* 133: 283-300.
- Hertel H. and Maronde U. (1987b): The physiology and morphology of centrally projecting visual interneurons in the honeybee brain. *Journal of Experimental Biology* 133: 301-315.
- Hofbauer A. and Buchner E. (1986): Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften* 76: 335-336.
- Hofer S. (2004): The circadian system of the cockroach *Leucophaea maderae*: Role of the neuropeptide Orcokinin and light entrainment. Dissertation, Chapter V: Involvement of the ocelli of the cockroach *Leucophaea maderae* in entrainment of the circadian clock.
- Homberg U. (1985): Interneurones of the central complex of the bee brain (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 31: 251-264.
- Homberg U., Davis N.T. and Hildebrand J.G. (1991a): Peptide-immunocytochemistry of neurosecretory cells in the brain and retrocerebral complex of the sphinx moth *Manduca sexta*. *The Journal of Comparative Neurology* 303: 35-52.
- Homberg U., Würden S., Dirksen H. and Rao K.R. (1991b): Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cell and Tissue Research* 266: 343-357.
- Homberg U., Reischig T. and Stengl M. (2003): Neural organization of the circadian system of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Chronobiology International* 20: 577-591.
- Homberg U. (2004): In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91: 199-208.
- Hussaini S.A., Bogusch L., Landgraf T. and Menzel R. (2009): Sleep deprivation affects extinction but not acquisition memory in honeybees. *Learning & Memory* 16: 698-705.
- Hyun S., Lee Y., Hong S.-T., Bang S., Paik D., Kang J., Shin J., Lee J., Jeon K., Hwang S., Bae E. and Kim J. (2005): *Drosophila* GPCR Han is a Receptor for the Circadian Clock Neuropeptide PDF. *Neuron* 48: 267-278.
- Im S.H. and Taghert P.H. (2010): PDF receptor expression reveals direct interactions between circadian oscillators in *Drosophila*. *Journal of Comparative Neurology* 518: 1925-1945.
- Kaiser W. (1988): Busy bees need rest, too. *The Journal of Comp. Physiology A* 163: 565-584.
- Kaneko M., Helfrich-Förster C. and Hall J.C. (1997): Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pace-maker candidates and novel features of clock gene product cycling. *The Journal of Neuroscience* 17: 6745-6760.
- Kirschner S., Kleineidam C.J., Zube C., Rybak J., Grünewald B. and Rössler W. (2006): Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Comp. Neurology* 499: 933-952.
- Klein B.A., Olzoway K.M., Klein A., Saunders K.M. and Seeley T. (2008): Caste-dependent sleep of worker honey bees. *The Journal of Experimental Biology* 211: 3028-3040.
- Konopka R.J. and Benzer S. (1971): Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 68: 2112-2116.
- Kubo T., Sasaki M., Nakamura J., Sasagawa H., Ohashi K., Takeuchi H. and Natori S. (1996): Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *The Journal of Biochemistry* 119: 291-295.
- Kula E., Levitan E.S., Pyza E. and Rosbash M. (2006): PDF cycling in the dorsal protocerebrum of the *Drosophila* brain is not necessary for circadian clock function. *Journal of Biological Rhythms* 21: 104-117.
- Le Conte Y. and Hefetz A. (2008): Primer pheromones in social hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 53: 523-542.
- Lear B.C., Merrill E., Lin J.-M., Schroeder A., Zhang L. and Allada R. (2005): A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* 48: 221-227.

- Levine J.D., Funes P., Dowse H.B. and Hall J.C. (2002): Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298: 2010-2012.
- Lindauer M. (1952): Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Journal of Comparative Physiology A* 34: 299-345.
- Liu X., Zwiebel L., Hinton D., Benzer S., Hall J.C. and Rosbash M. (1992): The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 12: 2735-2744.
- Loesel R. and Homberg U. (2001): Anatomy and physiology of neurons with processes in the accessory medulla of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of Comparative Neurology* 439: 193-207.
- Mares S., Ash L. and Gronenberg W. (2005): Brain allometry in bumblebee and honey bee workers. *Brain Behavior and Evolution* 66: 50-61.
- Matsushima A., Sato S., Chuman Y., Takeda Y., Yokotani S., Nose T., Tominaga Y., Shimohigashi M. and Shimohigashi Y. (2004): cDNA cloning of the housefly pigment-dispersing factor (PDF) precursor protein and its peptide comparison among the insect circadian neuropeptides. *Journal of Peptide Science* 10: 82-91.
- Maywood E.S., Reddy A.B., Wong G.K.Y., Neill J.S., O'Brien J.A., McMahon D.G., Harmar A.J., Okamura H. and Hastings M.H. (2006): Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology* 16: 599-605.
- Meelkop E., Temmermann L., Schoofs L. and Janssen T. (2011): Signalling through pigment dispersing hormone-like peptides in invertebrates. *Progress in Neurobiology* 93: 125-147.
- Meinertzhagen I.A. and Pyza E. (1996): Daily rhythms in cells of the fly's optic lobe: taking time out from the circadian clock. *Trends in Neuroscience* 19: 285-291.
- Meinertzhagen I.A. and Pyza E. (1999): Neurotransmitter regulation of circadian structural changes in the fly's visual system. *Microscopy Research and Technique* 45: 96-105.
- Menzel R. (1987): Farbensehen blütenbesuchender Insekten. Bundesministerium für Forschung und Technologie, Jülich.
- Menzel R. und Snyder A.W. (1974): Polarised light detection in the bee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* 88: 247-270.
- Mertens I., Vandingenen A., Johnson E.C., Shafer O.T., Li W., Trigg J.S., De Loof A., Schoofs L. and Taghert P.H. (2005): PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* 48: 213-219.
- Milde J. (1988): Visual responses of interneurons in the posterior median protocerebrum and the central complex of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 34: 427-436.
- Miśkiewicz K., Pyza E. and Schürmann F.-W. (2004): Ultrastructural characteristics of circadian pacemaker neurons, immunoreactive to an antibody against a pigment-dispersing hormone in the fly's brain. *Neuroscience Letters* 363: 73-77.
- Miśkiewicz K., Schürmann F.-W. and Pyza E. (2008): Circadian release of pigment-dispersing factor in the visual system of the housefly, *Musca domestica*. *The Journal of Comparative Neurology* 509: 422-435.
- Mobbs P.G. (1982): The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 298: 309-354.
- Mobbs P.G. (1985): Brain structure. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Oxford: Pergamon Press. 299-370.
- Moore D. and Rankin M.A. (1985): Circadian locomotor rhythms in individual honeybees. *Physiological Entomology* 10: 191-197.
- Moore D., Angel J.E., Cheeseman I.M., Fahrbach S.E. and Robinson G.E. (1998): Timekeeping in the honey bee colony: integration of circadian rhythms and division of labor. *Behavioral Ecology Sociobiology* 43: 147-160.

- Moore D. (2001): Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *Journal of Insect Physiology* 47: 843-857.
- Moritz R.F.A. and Sakovsky F. (1991): The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 29: 361-365.
- Mota T., Yamagata N., Giurfa M., Gronenberg W. and Sandoz J.C. (2011): Neural Organization and visual processing in the anterior optic tubercle of the honeybee brain. *The Journal of Neuroscience* 31: 11443-11456.
- Mrosovsky N. (1999): Masking: history, definitions, and measurement. Minireview. *Chronobiology International* 16: 415-429.
- Nässel D.R., Shiga S., Wikstrand E.M. and Rao R. (1991): Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons and their relation to serotonergic neurons in the blowfly and cockroach visual system. *Cell Tissue Research* 266: 511-523.
- Nässel D.R. (2002): Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila melanogaster* and other insects: multiple roles of neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiol.* 68: 1-84.
- Nässel D.R. and Homberg U. (2006): Neuropeptides in interneurons of the insect brain. *Cell Tissue Research* 326: 1-24.
- Nowotnick K. (2004): Die Honigbiene. Die neue Brehm-Bücherei. Westarp Wissenschaften-Verlagsgesellschaft mbH, Hohenwarsleben Bd. 31.
- Pan K.C. and Goodman L.J. (1977): Ocellar projections within the central nervous system of the honey bee, *Apis mellifera*. *Cell and Tissue Research* 176: 505-527.
- Park J.H. and Hall J.C. (1998): Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms* 13: 219-228.
- Park J.H., Helfrich-Förster C., Lee G., Liu L., Rosbash M. and Hall J.C. (2000): Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *PNAS* 97: 3608-3613.
- Persson M.G., Eklund M.B., Dirksen H., Muren J.E. and Nässel D.R. (2001): Pigment-dispersing factor in the locust abdominal ganglia may have roles as circulating neurohormones and central modulator. *Journal of Neurobiology* 48: 19-41.
- Peschel N. and Helfrich-Förster C. (2011): Setting the clock – by nature: Circadian rhythm in the fruitfly. *FEBS Letters* 585: 1435-1442.
- Petri B., Stengl M., Würden S. and Homberg U. (1995): Immunocytochemical characterization of the accessory medulla in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell and Tissue Research* 282: 3-19.
- Petri B. and Stengl M. (1997): Pigment-dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of Neuroscience* 17: 4087-4093.
- Pittendrigh C. (1954): On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *PNAS* 40: 1018-1029.
- Pittendrigh C. and Bruce V. (1957): An oscillator model for biological clocks. In: Rudnick, D., editor. *Rhythmic and synthetic processes in growth*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, pp. 75-109.
- Pittendrigh C., Bruce V. and Kaus P. (1958): On the significance of transients in daily rhythms. *PNAS* 44: 965-973.
- Pittendrigh C. and Daan S. (1976): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clocks. *Journal of Comparative Physiology A* 106: 291-331.
- Price J.L., Blau J., Rothenfluh A., Abodeely M., Kloss B. and Young M.W. (1998): *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94: 83-95.
- Pyza E. and Meinertzhagen I.A. (1997a): Neurites of period-expressing PDH cells in the fly's optic lobe exhibit circadian oscillations in morphology. *European Journal of Neuroscience* 9: 1784-1788.



- Pyza E. and Meinertzhagen I.A. (1997b): Circadian rhythms in screening pigment and invaginating organelles in photoreceptor terminals of the housefly's first optic neuropile. *Journal of Neurobiology* 32: 517-29.
- Pyza E. and Meinertzhagen I.A. (1999): Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropil in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology* 40: 77-88.
- Pyza E., Siuta T. and Tanimura T. (2003): Development of PDF-immunoreactive cells, possible clock neurons, in the housefly *Musca domestica*. *Microscopy Research and Technique* 62: 103-13.
- Rao K.R. and Riehm J.P. (1988): Pigment-dispersing hormones: a novel family of neuropeptides from arthropods. *Peptides* 9: 153-159.
- Rao K.R. (1992): Crustacean pigment dispersing hormones: chemistry, distribution and actions. *Pigment Cell Research*: 266-270.
- Reischig T. and Stengl M. (1996): Morphology and pigment-dispersing hormone immunocytochemistry of the accessory medulla, the presumptive circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Research* 285: 305-319.
- Reischig T. and Stengl M. (2002): Optic lobe commissures in a three-dimensional brain model of the cockroach *Leucophaea maderae*: a search for the circadian coupling pathway. *Journal of Comparative Neurology* 443: 388-400.
- Reischig T. and Stengl M. (2003a): Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *The Journal of Experimental Biology* 206: 1877-1886.
- Reischig T. and Stengl M. (2003b): Ultrastructure of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in a three-dimensional model of the accessory medulla of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Research* 314: 421-435.
- Renn S.C.P., Park J.H., Rosbash M., Hall J.C. and Taghert P.H. (1999): A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99: 791-802.
- Reppert S.M. and Weaver D.R. (2001): Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology* 63: 647-676.
- Ribi W.A. (1974): Neurons in the first synaptic region of the bee, *Apis mellifera*. *Cell and Tissue Research* 148: 277-286.
- Ribi W.A. (1975): The neurons of the first optic ganglion of the bee, *Apis mellifera*. *Advances in Anatomy* 50: 1-43.
- Ribi W.A. (1976): The first optic ganglion of the bee. II. Topographical relationships of the monopolar cells within and between cartridges. *Cell and Tissue Research* 171: 359-373.
- Ribi W.A. (1979): The first optic ganglion of the bee. III. Regional comparison of the morphology of photoreceptor-cell axons. *Cell and Tissue Research* 200: 345-357.
- Ribi W.A. and Scheel M. (1981): The second and third optic ganglia of the worker bee: Golgi studies of the neuronal elements in the medulla and lobula. *Cell Tissue Research* 221: 17-43.
- Ribi W., Warrant E. and Zeil J. (2011): The organization of honeybee ocelli: regional specializations and rhabdom arrangements. *Arthropod Structure & Development* 40: 509-520.
- Rieger D. (2007): Die Innere Uhr von *Drosophila melanogaster*. Dissertation – Naturwissenschaftliche Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin, der Universität Regensburg.
- Robenek H. (1995): *Mikroskopie in Forschung und Praxis*. GIT Verlag GmbH, Darmstadt.
- Robinson G.E. (1992): Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology* 37: 637-665.
- Rubin E.B., Shemesh Y., Cohen M., Elgavish S., Robertson H.M. and Bloch G. (2006): Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Research* 16: 1352-1365.

- Rutila J.E., Suri V., Le M., So W.V., Rosbash M. and Hall J.C. (1998): CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93: 805-814.
- Rybak J., Kuß A., Lamecker H., Zachow S., Hege H.-C., Lienhard M., Singer J., Neubert K. and Menzel R. (2010): The digital bee brain: integrating and managing neurons in a common 3D reference system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, Vol. 4, Article 30.
- Rybak J. and Menzel R. (1993): Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *Journal of Comparative Neurology* 334: 444-465.
- Sauer S., Kinkelin M., Herrmann E. and Kaiser W. (2003): The dynamics of sleep-like behaviour in honey bees. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 599-607.
- Sauer S., Herrmann E. and Kaiser W. (2004): Sleep deprivation in honey bees. *Journal of Sleep Research* 13: 145-152.
- Sauman I. and Reppert S.M. (1996): Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi* – novel mechanisms of period protein regulation. *Neuron* 17: 889-900.
- Schulz W.-D., Schlüter U. and Seifert G. (1984): Extraocular photoreceptors in the brain of *Epilachna varivestis* (Coleoptera, Coccinellidae). *Cell and Tissue Research* 236: 317-320.
- Schwarz S., Albert L., Wystrach A. and Cheng K. (2011): Ocelli contribute to the encoding of celestial compass information in the Australian desert ant *Melophorus bagoti*. *Journal of Experimental Biology* 214: 901-906.
- Seeley T.D. (1995): The wisdom of the hive. The social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press, Cambridge Mass. [Deutsch (1997): Honigbienen. Im Mikrokosmos des Bienenstocks. Birkhäuser, Basel Boston Berlin.]
- Sehgal A., Price J.L. and Young M.W. (1994): Loss of circadian behavioural rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263: 1603-1606.
- Shafer O.T., Kim D.J., Dunbar-Yaffe R., Nikolaev V.O., Lohse M.J. and Taghert P.H. (2008): Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cycle AMP imaging. *Neuron* 58: 223-237.
- Sheeba V., Fogle K.J., Kaneko M., Rashid S., Chou Y.-T., Sharma V.K. and Holmes T.C. (2008): Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Current Biol.* 18: 1-9.
- Shemesh Y., Cohen M. and Bloch G. (2007): Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees. *The FASEB Journal* 21: 2304-2311.
- Shemesh Y., Eban-Rothschild A., Cohen M. and Bloch G. (2010): Molecular dynamics and social regulation of context-dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee. *The Journal of Neuroscience* 30: 12517-12525.
- Southwick E.E. and Moritz R.F.A. (1987): Social synchronization of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology* 12: 209-212.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S.A., Rosbash M. and Hall J.C. (1998): The cry<sup>b</sup> mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95: 681-692.
- Stengl M. and Homberg U. (1994): Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach *Leucophaea maderae* share properties with circadian pacemaker neurons. *Journal of Comparative Physiology A* 175: 203-213.
- Stephan F.K. (2002): The “other” circadian system: food as a zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms* 17: 284-292.
- Stewart W.W. (1978): Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14: 741-759.
- Stoleru D., Peng Y., Agosto J. and Rosbash M. (2004): Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* 431: 862-868.
- Strausfeld N.J. (2002): Organization of the honey bee mushroom body: Representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *The Journal of Comparative Neurology* 450: 4-33.

- Tautz J. (2007): Phänomen Honigbiene. Spektrum akademischer Verlag, Elsevier GmbH München.
- Tomioka K. and Chiba Y. (1982): Post-embryonic development of circadian rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*: a rhythm reversal. *Journal of Comparative Physiology A* 147: 299-304.
- Toma D.P., Bloch G., Moore D. and Robinson G.E. (2000): Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *PNAS* 97: 6914-6919.
- Vafopoulou X., Terry K.L. and Steel C.G.H. (2010): The circadian timing system in the brain of the fifth larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *The Journal of Comparative Neurology* 518: 1264-1282.
- Velarde R.A., Sauer C.S., Walden K.K.O., Fahrbach S.E. and Robertson H.M. (2005): Pteropsin: a vertebrate-like non-visual opsin expressed in the honey bee brain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1367-1377.
- Vosshall L.B. and Young M.W. (1995): Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by *period* expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* 15: 239-255.
- Wakakuwa M., Kurasawa M., Giurfa M. and Arikawa K. (2005): Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften* 92: 464-467.
- Weaver D.R. (1998): The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Journal of Biological Rhythms* 13: 100-112.
- Wei H., el Jundi B., Homberg U. and Stengl M. (2010): Implementation of pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in a standardized atlas of the brain of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of Comparative Neurology* 518: 4113-4133.
- Wei H. and Stengl M. (2011): Light affects the branching pattern of peptidergic circadian pacemaker neurons in the brain of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Journal of Biological Rhythms* 26: 507-517.
- Weiss R., Dov A., Fahrbach S.E. and Bloch G. (2009): Body size-related variation in pigment dispersing factor-immunoreactivity in the brain of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Insect Physiology* 55: 479-487.
- Yamaguchi S. and Heisenberg M. (2011): Photoreceptors and neural circuitry underlying phototaxis in insects. *Fly* 5: 333-336.
- Yerushalmi S., Bodenheimer S. and Bloch G. (2006): Developmentally determined attenuation in circadian rhythms links chronobiology to social organization in bees. *Journal of Experimental Biology* 209: 1044-1051.
- Yoshii T., Heshiki Y., Ibuki-Ishibashi T., Matsumoto A., Tanimura T. and Tomioka K. (2005): Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *European Journal of Neuroscience* 22: 1176-1184.
- Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D. and Reppert S.M. (2007): Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular Biology and Evolution* 24: 948-955.
- Zamboni L. and DeMartino C. (1976): Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 35: 148A.
- Závodská R., Sauman I. and Sehnaľ F. (2003): Distribution of PER protein, pigment-dispersing hormone, prothoracicotropic hormone, and eclosion hormone in the cephalic nervous system of insects. *Journal of Biological Rhythms* 18: 106-122.
- Závodská R., Wen C.-J., Sehnaľ F., Hrdý I., Lee H.-J. and Sauman I. (2009): Corazonin- and PDF-immunoreactivities in the cephalic ganglia of termites. *Journal of Insect Physiology* 55: 441-449.

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Frau Charlotte Förster, die mit ihrem Verständnis für Frauen mit Kindern es mir überhaupt erst ermöglicht hat, zu promovieren. Ohne ihr Einfühlungsvermögen für organisatorische Probleme mit Kleinkindern wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Außerdem möchte ich ihr dafür danken, dass sie auch unter größtem Stress immer ein offenes Ohr für ihre Mitarbeiter hatte und mir stets mit ihrer fachlichen Kompetenz zur Seite stand.

Als nächstes möchte ich meinem Mann danken, der mir Mut zugesprochen hat, diese Dissertation zu Ende zu führen.

Zudem danke ich Dirk Rieger, der mir im Labor und beim Benutzen zahlreicher Computerprogramme hilfreich zur Seite stand. Vielen Dank spreche ich auch Taishi Yoshii aus, der bei der Probenahme über 24 Stunden geholfen und mitpräpariert hat. Christa Kistenpfennig und Verena Dusik möchte ich danken für das viele „Proben aus dem Kühlschrank holen“ in den Morgenstunden und die schöne Atmosphäre im Labor. Außerdem danke ich Corinna Wülbeck für die Unterstützung bei Fragen im Labor und mit dem Laserscanningmikroskop.

Zum Schluss danke ich noch meiner Mutter und meinen Schwiegereltern, die trotz großer Entfernung zu uns auch kurzfristig unsere Kinder betreut haben, wenn ich viel im Labor zu tun hatte oder für einige Tage unterwegs war, sowie meinem Vater und meiner Schwiegermutter, die mir bei der Korrektur und bei sprachlichen Fragen zur Seite standen.

## **8 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet. Die hier vorliegende Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Regensburg, 29.10.2013

Esther Kolbe